



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
Departamento de Botânica  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal**



**MARIA LETÍCIA NEVES FIGUEIREDO**

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E EVOLUÇÃO DE  
OSMÓFOROS E NECTÁRIOS EM SPIRANTHINAE  
LINDL. EX MEISN. (ORCHIDACEAE)**

Belo Horizonte/MG  
Fevereiro 2018



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
Departamento de Botânica  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal**



**MARIA LETÍCIA NEVES FIGUEIREDO**

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E EVOLUÇÃO DE  
OSMÓFOROS E NECTÁRIOS EM SPIRANTHINAE  
LINDL. EX MEISN. (ORCHIDACEAE)**

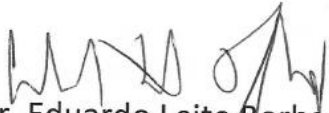
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Área de concentração: Morfologia, Sistemática e Diversidade Vegetal

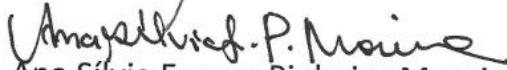
Orientação: Prof. Dr. Eduardo Leite Borba  
Coorientação: Prof. Dr. Élder Antônio Sousa Paiva

Belo Horizonte/MG  
Fevereiro 2018

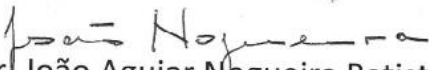
Dissertação defendida pela mestranda Maria Leticia Neves de Figueiredo e aprovada em 16 de fevereiro de 2018, pela banca examinadora constituída pelos professores:



Dr. Eduardo Leite Borba (UFMG)



Dra. Ana Sílvia Franco Pinheiro Moreira (UFU)



Dr. João Aguiar Nogueira Batista (UFMG)

“Sweet is the lore which nature brings;  
Our meddling intellect  
Mis-shapes the beauteous forms of things;  
-- We murder to dissect.

Enough of science and of art;  
Close up these barren leaves;  
Come forth, and bring with you a heart  
That watches and receives.”

- William Wordsworth – *The Tables  
Turned*, 1798

## **AGRADECIMENTOS**

Colocar em palavras a gratidão que tenho por todos aqueles que me acompanharam nesses dois anos e meio de mestrado provou-se uma tarefa tão árdua quanto a escrita desta dissertação. Eu não acredito que simples palavras sejam capazes de expressar essa gratidão, mas espero que eu possa dar aqui uma noção dela.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal e a todo o Departamento de Botânica da UFMG, principalmente ao Colegiado e a professora Rosy, por confiarem em mim, e na minha capacidade de apresentar um bom trabalho com a extensão do prazo. Espero que este esteja à altura de suas expectativas.

À CAPES pela bolsa concedida durante o mestrado.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFMG e sua equipe, que me ajudaram a obter imagens de microscopia eletrônica da varredura e transmissão que considero fascinantes.

À todos os professores do Departamento de Botânica da UFMG, que estiveram comigo desde a graduação, com quem aprendi tanto e que me incentivaram até o fim deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Anatomia Vegetal, por demonstrarem sempre seu apoio e pela disposição em me ajudar sempre que eu me via “empacada” em algum problema. E nesta equipe, agradeço muito ao técnico Wagner Rocha, que teve tanta paciência em me ajudar a preparar o bendito Karnovsky por tantas vezes, e por estar sempre à disposição para ajudar e tirar dúvidas.

Ao Carlos, da Fundação Zôo-Botânica de Belo Horizonte, Jacqueline do Museu de História Natural e Jardim Botânico da UFMG, Jader Caetano, Dr. Emerson Pansarin, Dr. Eduardo Borba, Dr. João Batista, Dr. Élder Paiva, Dr. Gerardo Salazar e às queridas orquidólogas Cecília Fiorini, Gabriela Cruz e Mariana Duarte pela ajuda na coleta e obtenção de material.

Aos meus orientadores Eduardo Borba e Élder Paiva, por terem tido a paciência de me orientar, mesmo nos meus piores momentos, e por não terem desistido de mim e terem me ajudado a concluir este trabalho.

À Dra. Ana Sílvia Moreira, Dr. João Batista, Dra. Renata Maria Meira, Dr. Rafael Felipe de Almeida, Dra. Maria das Graças Sajo e Dr. Fernando Vale por concordarem em fazer parte da minha banca de defesa de dissertação e por toda contribuição que terei por parte de vocês para melhorar este trabalho.

À Andrea Lanna e Igor Ballego por me socorrerem em um momento em que eu estava totalmente desesperada. Sem vocês, este trabalho não teria sido finalizado. Me considero abençoada por ter tido ajuda de duas pessoas tão incríveis, tão inteligentes e tão carinhosas. Mais abençoada ainda por ter sido alimentada pela Andrea com tantos bolos e brownies maravilhosos. Garanto que isso fez toda a diferença para que eu mantivesse o bom humor.

Aos meus amigos, todos vocês que me acompanharam, riram e choraram comigo, que escutaram eu repetir meus lamentos tantas vezes e que me perdoaram pelos meus 'sumiços'. Recebi abraços, sorrisos, compreensão, paciência, e acima de tudo, carinho. Cada um de vocês fez uma diferença imensa nestes dois anos e meio de mestrado, e agradeço à Deus por ter pessoas tão maravilhosas na minha vida. Não vou colocar os nomes de todos aqui, nem tentarei descrever tudo que fizeram por mim, pois temo esquecer alguém. Vocês sabem quem são, sabem que são especiais para mim, e o quanto sou grata por tudo. Que eu possa sempre retribuir esse carinho tão grande que vocês demonstraram por mim, mesmo quando eu achava que estava incomodando.

Ao Luiz Eduardo, que escutou meu choro inúmeras vezes e nunca deixou de me apoiar. Por dizer que acreditava na minha capacidade e que me incentivou a não desistir e a fazer dessa experiência um aprendizado para que eu me tornasse uma pessoa melhor. Espero continuar aprendendo cada vez mais com você a transformar essas experiências da vida em sabedoria.

E finalmente às duas pessoas mais importantes da minha vida: meus pais. Agradeço por nunca duvidarem do meu potencial, por sempre incentivarem meus sonhos e por serem tão presentes na minha vida. Todas as minhas conquistas são graças a vocês e a tudo que me ensinaram e continuam me ensinando. Vocês são meus maiores modelos, e espero um dia ser uma pessoa tão boa como vocês.

Agradeço a todos que não me deixaram desistir, que me deram forças e me mostraram que, por mais fraca que eu me sinta, não é impossível superar as dificuldades que a vida apresenta. Muito obrigada!

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	3
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	5
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	9
<i>Material vegetal e área de coleta</i> .....	9
<i>Morfologia e biologia floral</i> .....	10
<i>Microscopia de luz</i> .....	10
<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i> .....	11
<i>Microscopia eletrônica de transmissão (MET)</i> .....	11
<i>Análise morfométrica multivariada</i> .....	11
<i>Otimização de caracteres estruturais</i> .....	12
<b>RESULTADOS</b> .....	12
<i>Morfologia floral</i> .....	12
<i>Análises estruturais</i> .....	18
<i>Análises micromorfológicas</i> .....	21
<i>Análises ultraestruturais</i> .....	22
<i>Análise morfométrica multivariada</i> .....	23
<b>DISCUSSÃO</b> .....	26
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	30

## 1 **RESUMO**

2

3 Osmóforos e nectários são componentes essenciais em flores de orquídeas, estando  
4 associados à elevada especialização da polinização na família. Em *Spiranthinae*, a  
5 presença de osmóforos foi descrita para a face abaxial do labelo, localização incomum  
6 em flores de orquídeas. Nessa subtribo, a região de armazenamento do néctar é  
7 essencialmente delimitada pela base do labelo, pelo pé da coluna e pelas sépalas laterais.  
8 Estudos, principalmente de biologia floral, apontam a presença de aurículas produtoras  
9 de néctar na base do labelo, em projeções laterais ou intumescimentos com células  
10 glandulares, em diversas espécies do grupo. A estrutura geral das flores das *Spiranthinae*  
11 indica que a síndrome da melitofilia é a mais comum e amplamente distribuída no grupo.  
12 Alternativas à melitofilia parecem demonstrar uma irradiação adaptativa na subtribo para  
13 diversos grupos de polinizadores (mariposas, borboletas e beija-flores), provavelmente a  
14 partir de uma condição ancestral melitófila. Em decorrência da ampla variação observada  
15 nas síndromes de polinização nas *Spiranthinae*, e às estruturas não usuais dos nectários e  
16 osmóforos já observados para o grupo, neste trabalho descrevemos a morfologia e  
17 anatomia destas estruturas no labelo de espécies de diferentes linhagens da subtribo para  
18 associar a ocorrência e características destas estruturas secretoras com os mecanismos de  
19 polinização e grupos de polinizadores e inferir sua evolução no grupo. Foram coletadas  
20 flores de indivíduos pertencentes a 17 espécies da tribo *Cranichideae* (14 de *Spiranthinae*  
21 e três do grupo irmão *Cranichidinae*) e feitas análises morfológicas, de microscopia de  
22 luz, transmissão e varredura, além de análise morfométrica multivariada e de otimização  
23 dos caracteres estruturais por parcimônia. Os resultados indicam que as aurículas  
24 encontradas na base do labelo são efetivamente nectários, e que a posição mais comum  
25 dos osmóforos na subtribo é na face abaxial do labelo. No dendrograma construído a  
26 partir da matriz com todos os caracteres há poucos grupos bem definidos, em função da  
27 baixa similaridade geral entre as espécies. Uma primeira divisão no dendrograma separa  
28 todas as espécies de *Spiranthinae* em um grupo e as espécies de *Cranichidinae* constituem  
29 um outro grupo. O único grupo formado inteiramente por e incluindo todas as espécies  
30 apresentando uma mesma síndrome de polinização é o constituído pelas espécies  
31 ornitófilas, que aparece como o mais coeso e diferenciado na análise utilizando apenas os  
32 caracteres anatômicos, porém este grupo não é recuperado na análise com apenas os  
33 caracteres morfológicos. Nenhum dos grupos citados na análise utilizando apenas os



1 caracteres anatômicos foi recuperado na análise empregando a matriz com apenas os  
2 caracteres morfológicos, e esta última não reflete nem as síndromes de polinização e nem  
3 a filogenia do grupo. Todos os caracteres anatômicos apresentaram algum grau de  
4 homoplasia, o qual eventualmente foi elevado. De uma maneira geral, foi observada  
5 muito pouca correlação entre a evolução destes caracteres e a filogenia do grupo ou com  
6 as síndromes de polinização. Exceções notáveis estão relacionadas à ornitofilia e à  
7 polinização por polinizadores com aparato bucal longo, e eventuais sinapomorfias de  
8 clados principais.

9

10 **Palavras-chave:** anatomia floral; nectários; Orchidaceae; osmóforos; síndromes de  
11 polinização; Spiranthinae

12

1 **ABSTRACT**

2

3 Osmophores and nectaries are essential components in orchid flowers, being associated  
4 with the high specialization of pollination in the family. In Spiranthinae, the presence of  
5 osmophores was described for the abaxial aspect of the lip, an unusual location in orchid  
6 flowers. In this subtribe, the nectar storage region is essentially delimited by the base of  
7 the lip, the foot of the column and the lateral sepals. Studies, mainly of floral biology,  
8 indicate the presence of nectar producing auricles at the base of the lip, in lateral  
9 projections or swellings with glandular cells, in several species of the group. The general  
10 structure of Spiranthinae flowers indicates that the syndrome of melittophily is the most  
11 common and widely distributed in the group. Alternatives to melittophily seem to  
12 demonstrate an adaptive irradiation in the subtribe for several groups of pollinators  
13 (moths, butterflies and hummingbirds), probably from an ancestral melittophilic  
14 condition. As a result of the wide variation observed in the Spiranthinae pollination  
15 syndromes and the unusual structures of the nectars and osmophores already observed for  
16 the group, this work describes the morphology and anatomy of osmophors and floral  
17 nectaries in species of different lineages of the subtribe to associate the occurrence and  
18 characteristics of these secretory structures with pollination mechanisms and groups of  
19 pollinators and their evolution in the group. Flowers of individuals belonging to 17  
20 species of the Cranichideae tribe (14 Spiranthinae and three of its sister group,  
21 Cranichidinae) were collected and morphological, light microscopy, transmission and  
22 scanning analysis were performed, as well as multivariate morphometric analysis and  
23 optimization of structural characters for parsimony. The results indicate that the auricles  
24 found at the base of the lip are effectively nectaries, and that the most common position  
25 of the osmophores in the subtribe is the abaxial surface of the lip. In the dendrogram  
26 constructed from the matrix with all the characters there are few well defined groups, due  
27 to the low general similarity between the species. A first division in the dendrogram  
28 separates all species of Spiranthinae in one group and the species of Cranichidinae  
29 constituting another group. The only group formed entirely by and including all species  
30 exhibiting the same pollination syndrome is the ornithophilous species, which appears as  
31 the most cohesive and differentiated in the analysis using only the anatomical characters.  
32 None of the groups mentioned in the analysis using only the anatomical characters was  
33 retrieved in the analysis employing the matrix with only the morphological characters,

1 and the latter did not reflect both the pollination syndromes and the phylogeny of the  
2 group. All anatomical characters presented some degree of homoplasy, which eventually  
3 was elevated. In general, very little correlation was observed between the evolution of  
4 these characters and the phylogeny of the group or the pollination syndromes. Notable  
5 exceptions are related to ornithophily and pollination by pollinators with long buccal  
6 apparatus, and eventual synapomorphies of main clades.

7

8 **Keywords:** floral anatomy; nectaries; Orchidaceae; osmophores; pollination syndromes;  
9 Spiranthinae

10

## 1 INTRODUÇÃO

2  
3 A especialização de flores para a atração de polinizadores específicos é  
4 característica marcante da família Orchidaceae. Desde a zigomorfia floral, com a presença  
5 de uma pétala modificada - o labelo, usualmente em posição inferior devido ao  
6 ressupinamento da flor, até o tamanho e posição da cavidade nectarífera, as flores de  
7 orquídeas apresentam formas que levam à grande especificidade do tamanho e  
8 comportamento do polinizador. A maioria dos representantes da família é polinizada por  
9 himenópteras, provavelmente uma condição ancestral no grupo, e que levou às primeiras  
10 modificações surgidas nas flores (Dressler, 1981). As flores que apresentam síndrome  
11 melitófila (polinizadas por abelhas), geralmente possuem odor diurno agradável, perianto  
12 amarelo e diversos tons de roxo, além de guias de néctar direcionando o polinizador à  
13 recompensa (van der Pijl & Dodson, 1966). Por não enxergarem a cor vermelha, as  
14 abelhas não costumam acessar recursos de flores com esta coloração. Beija-flores  
15 aprendem então que flores de perianto vermelho, alaranjado, rosado, são mais propensas  
16 a oferecer recompensas. A síndrome de psicofilia, polinização por borboletas, é bastante  
17 similar à de ornitofilia, exceto pelo fato de que flores psicófilas costumam apresentar odor  
18 (às vezes imperceptível), além do perianto chamativo. Diferentemente das borboletas,  
19 mariposas são noturnas, e logo flores de síndrome falenófila costumam ter perianto  
20 branco/esverdeado e liberar forte odor adocicado a noite (van der Pijl & Dodson, 1966;  
21 Dressler, 1981).

22 A tribo Cranichideae, da família Orchidaceae, possui distribuição nos trópicos e  
23 neotrópicos, com sete subtribos e mais de 90 gêneros (Salazar, 2003). Spiranthinae Lindl.  
24 ex Meisn. é uma dessas subtribos que forma um grupo monofilético com a subtribo  
25 Cranichidinae, e possui cinco grandes clados com mais de 400 espécies. São  
26 caracterizadas por serem ervas majoritariamente terrestres e sua distribuição se dá  
27 principalmente no neotrópico (Salazar, 2003; Salazar *et al.*, 2003, 2011, no prelo). Apesar  
28 de ser considerado um grupo monofilético, Spiranthinae não apresenta sinapomorfias  
29 morfológicas evidentes que as diferencie das demais subtribos. A estrutura geral das  
30 flores de Spiranthinae indica que a síndrome da melitofilia é a mais comum e amplamente  
31 distribuída no grupo. Estudos de biologia floral têm confirmado as abelhas como grupo  
32 principal de polinizadores em Spiranthinae (Singer & Cocucci, 1999; Singer & Sazima,  
33 1999; Sanguinetti & Singer, 2014). Entretanto, outros estudos mostram que algumas

1 espécies são polinizadas por lepidópteros diurnos e noturnos, como mariposas em  
2 *Sauroglossum elatum* (Singer, 2002) e borboletas em *Pteroglossa* (Pansarin & Ferreira,  
3 2015), e por beija-flores, como em *Sacoila lanceolata*; (Catling, 1987; Singer & Sazima,  
4 2000) e espécies de *Dichromanthus* (Salazar, 2009). Estas alternativas à melitofilia  
5 parecem demonstrar uma irradiação adaptativa na subtribo para diversos grupos de  
6 polinizadores (mariposas, borboletas e beija-flores), provavelmente a partir de uma  
7 condição ancestral melitófila (Borba *et al.*, 2014). Salazar *et al.* (2011) sugerem que, em  
8 Spiranthinae, a polinização por beija-flores tenha surgido diversas vezes, notando a  
9 grande convergência dos caracteres florais específicas para esse tipo de polinização,  
10 sendo possível apontar gêneros de flores ornitófilas no clado 2 (*Sacoila*, *Skeptrostachys*  
11 e independentemente em *Stenorrhynchos*), no clado 3 (*Coccineorchis*), e no clado 5  
12 (*Dichromanthus* e independentemente em *Svenkoeltzia*), na análise filogenética mais  
13 recente proposta para a subtribo (veja Figura 1; adaptada de Salazar *et al.*, no prelo),  
14 sustentando esta hipótese.

15 Van der Pijl & Dodson, em seu livro “Orchid flowers: their pollination and  
16 evolution” (van der Pijl & Dodson, 1966), a principal obra de referência sobre polinização  
17 na família, mencionam exemplos de gêneros em Spiranthinae que são possivelmente  
18 ornitófilos, em um pequeno grupo de flores de coloração vermelha e rosada, como  
19 *Sacoila*, *Stenorrhynchos* e *Dichromanthus*, e sugere que sua polinização seja feita por  
20 beija-flores. Catling (1987) e Salazar *et al.* (2011) confirmaram a ocorrência de ornitofilia  
21 em *Sacoila lanceolata* e *Dichromanthus*, respectivamente, reforçando a hipótese  
22 apresentada por van der Pijl & Dodson (1966). As flores de *Sacoila* e *Dichromanthus*  
23 aparentemente não possuem odor, o que sugere a ausência de osmóforos, característica  
24 esperada em flores ornitófilas. Osmóforos e nectários são componentes essenciais em  
25 flores de orquídeas, pois estão associados aos altamente especializados processos de  
26 polinização na família. A presença ou ausência destas estruturas pode afetar a efetividade  
27 da polinização de uma espécie, determinando, em grande parte, as interações planta-  
28 polinizador e a eficiência do processo de polinização.

29 Os osmóforos são, geralmente, agregados de células glandulares epidérmicas, de  
30 morfologia variável, produtoras de secreções voláteis emissoras de odor. A presença de  
31 odores frescos levemente adocicados durante o dia é indicação de síndrome melitófila,  
32 enquanto que o odor fortemente adocicado no período noturno indica síndrome falenófila  
33 (Dressler, 1981). Essas glândulas produtoras de fragrâncias possuem células de

1 citoplasma denso e não acumulam suas secreções por longos períodos de tempo,  
2 normalmente secretando-as à medida que são produzidas (Vogel, 1990). Osmóforos  
3 ocorrem em posições variadas em flores de orquídeas (Dressler, 1981), sendo mais  
4 comumente encontrados na face adaxial do labelo, em regiões de calosidades, onde  
5 também se encontram guias de néctar, ou ainda no lobo terminal do labelo. O  
6 posicionamento das células dos osmóforos pode ser importante para guiar o polinizador  
7 à posição ideal em que ele deve pousar na flor (Dressler, 1981).

8 Em *Cyclopogon elatus*, Wiemer *et al.* (2009) registraram que os osmóforos estão  
9 dispostos na face abaxial do labelo, constituindo uma localização incomum para essas  
10 estruturas em flores de orquídeas, tendo sido este o primeiro estudo de anatomia dessas  
11 estruturas na subtribo Spiranthinae. Posteriormente, osmóforo na mesma localização,  
12 porém com estrutura diferente, foi descrito em *Cotylolabium*, gênero mono-específico e  
13 grupo irmão do restante da subtribo Spiranthinae (Borba *et al.* (2014) . Como *Cyclopogon*  
14 encontra-se em um dos clados mais derivados da subtribo, e devido o posicionamento  
15 filogenético de *Cotylolabium* (Borba *et al.*, 2014; Salazar *et al.*, no prelo), podemos supor  
16 que a posição dos osmóforos na face abaxial do labelo, não usual em orquídeas, pode ser  
17 conservada em Spiranthinae.

18 Nectários florais são estruturas secretoras que produzem néctar e estão  
19 diretamente associados à polinização, fornecendo recompensa aos polinizadores que  
20 visitam as flores, muitas vezes atraídos pelo odor liberado pelos osmóforos (Fahn, 1979;  
21 Wiemer *et al.*, 2009). Observações feitas por Dafni & Ivri (1979) demonstraram uma  
22 maior probabilidade de visitas e permanência de polinizadores em flores de orquídeas que  
23 ofertavam néctar. O tecido conhecido como nectarífero costuma consistir em uma  
24 epiderme, podendo conter tricomas associados, células parenquimáticas e estar associado  
25 a células do tecido vascular. O néctar pode ser liberado de diversas maneiras como, por  
26 exemplo, por meio de estômatos ou atravessando a barreira imposta pela cutícula (Paiva,  
27 2017). Tanto o volume quanto a concentração de açúcares do néctar estão frequentemente  
28 correlacionados com o tipo de polinizador, sendo usualmente mais concentrados em  
29 flores polinizadas por abelhas e mais diluídos e com maior volume em flores polinizadas  
30 por beija-flores e por lepidópteros (Proctor *et al.*, 1996).

31 Em Spiranthinae, a região de armazenamento do néctar é essencialmente  
32 delimitada pela base do labelo, pelo pé da coluna e pelas sépalas laterais. Porém, existe  
33 uma ampla variação morfológica na estrutura que armazena o néctar nas espécies do

1 grupo, podendo se apresentar como mento ou cálcio, por exemplo, ser mais gibosa,  
2 prolongada ou decurrente com o ovário, e essa variação aparentemente está associada ao  
3 tipo de polinizador (Dressler, 1981). A estrutura que armazena o néctar não  
4 necessariamente é a região de produção do mesmo, e sua localização não está relacionada  
5 à estrutura ou posição do nectário. Estudos, principalmente de biologia floral, apontam a  
6 presença de aurículas produtoras de néctar na base do labelo em diversas espécies de  
7 *Spiranthinae* (Singer & Cocucci, 1999; Singer & Sazima, 1999, 2000, 2001; Singer, 2002;  
8 Salazar & Ballesteros-Barrera, 2010; Salazar *et al.*, 2011; Sanguinetti & Singer, 2014;  
9 Pansarin & Ferreira, 2015). Essas aurículas, consideradas então nectários, estão mais  
10 próximas da base do labelo, em projeções laterais ou intumescimentos com células  
11 glandulares. *Cotylolabium lutzii*, previamente descrita como não possuindo nectários  
12 devido à ausência de tais aurículas, apresenta espessamentos na base do labelo, os quais  
13 efetivamente constituem nectários (Borba *et al.*, 2014)

14 Em decorrência da ampla variação observada nas síndromes de polinização nas  
15 *Spiranthinae* e às estruturas não usuais dos nectários e osmóforos já observados para o  
16 grupo, hipotetizamos que: 1) A posição do nectário em flores de *Spiranthinae* é  
17 conservada nos diferentes gêneros, independentemente da síndrome de polinização  
18 associada (predição: os nectários em *Spiranthinae* ocorrem apenas nas aurículas da base  
19 do labelo); 2) A estrutura do nectário em flores de *Spiranthinae* é variável e  
20 correlacionada à síndrome de polinização (predição: as flores melitófilas, que produzem  
21 néctar mais concentrado, possuem nectários estruturalmente diferentes daqueles de flores  
22 ornitófilas, falenófilas e psicófilas, que produzem néctar mais diluído e geralmente em  
23 maior volume, independentemente da relação filogenética); 3) A posição dos osmóforos  
24 em flores de *Spiranthinae* está correlacionada à síndrome de polinização (predições:  
25 flores melitófilas possuem osmóforos na face abaxial do labelo, independentemente do  
26 posicionamento filogenético; flores falenófilas, principalmente, mas eventualmente  
27 também em flores psicófilas, onde osmóforos usualmente funcionam como guias de  
28 néctar, possuem osmóforos em posição diferente das melitófilas, se posicionando na face  
29 adaxial do labelo; flores ornitófilas não apresentam osmóforos, independentemente do  
30 posicionamento filogenético do gênero, sendo essa perda uma homoplasia); 4) A estrutura  
31 dos osmóforos em flores de *Spiranthinae* não está correlacionada à síndrome de  
32 polinização (predição: variações estruturais que eventualmente ocorram estão associadas  
33 à linhagens, possuindo sinal filogenético).

1           Objetivando testar as hipóteses acima mencionadas, foi realizada a caracterização  
2 da morfologia e anatomia de osmóforos e nectários florais neste grupo, amostrando  
3 espécies representantes das diferentes linhagens da subtribo. Pretendemos, ainda, associar  
4 a ocorrência e características destas estruturas secretoras com os mecanismos de  
5 polinização e grupos de polinizadores, para traçar um primeiro esboço sobre a evolução  
6 destas estruturas neste peculiar grupo de orquídeas.

## 9   **MATERIAL E MÉTODOS**

### 11   *Material vegetal e área de coleta*

13           Foram examinadas flores de indivíduos pertencentes a 17 espécies da tribo  
14 Cranichideae, sendo 14 de Spiranthinae e, para efeito de comparação e análises  
15 evolutivas, três do grupo-irmão Cranichidinae. Para as Spiranthinae foram amostradas  
16 *Beloglottis mexicana* Garay & Hamer, *Cyclopogon chloroleucus* Barb.Rodr., *C. elatus*  
17 (Sw.) Schltr., *Cotylolabium lutzii* (Pabst) Garay, *Dichromanthus cinnabarinus* (Lex.)  
18 Garay, *Eltroplectris triloba* (Lindl.) Pabst, *Lankesterella ceracifolia* (Barb.Rodr.) Mansf.,  
19 *Mesadenella cuspidata* (Lindl.) Garay, *Pelexia pterygantha* (Rchb.f. & Warm.) Schltr.,  
20 *Pteroglossa roseo-alba* (Rchb.f.) Salazar & M.W.Chase, *Sacoila lanceolata* (Aubl.)  
21 Garay, *Sarcoglottis fasciculata* (Vell.) Schltr., *Sauroglossum elatum* Lindl. e  
22 *Skeptrostachys balanophorostachya* (Rchb.f. & Warm.) Garay; enquanto para as  
23 Cranichidinae foram amostradas *Cranichis candida* (Barb.Rodr.) Cogn., *Prescottia*  
24 *glazioviana* Cogn. e *P. oligantha* (Sw.) Lindl. (Figura 1). Para as espécies brasileiras  
25 foram realizadas coletas nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Santa Catarina, e  
26 também cultivo em casa de vegetação na Universidade Federal de Minas Gerais (Tabela  
27 1). As espécies não-ocorrentes no Brasil foram coletadas no México, com o auxílio do  
28 Prof. Dr. Gerardo A. Salazar, da Universidad Nacional Autónoma de México.

29           A escolha das espécies visou contemplar ao menos um representante de cada um  
30 dos principais clados da subtribo (Figura 1), de modo a analisar a natureza dos tecidos  
31 secretores e possíveis sinais filogenéticos. Essas espécies também representam as  
32 síndromes de polinização conhecidas para o grupo, segundo estudos de biologia floral  
33 publicados (Singer & Cocucci, 1999; Singer & Sazima, 1999, 2000; Singer, 2002;



1 Wiemer *et al.*, 2009; Pansarin & Ferreira, 2015) e caracteres morfológicos característicos  
2 de cada grupo de polinizadores. Foram analisadas espécies melitófilas (as mais  
3 amplamente abundantes no grupo), ornitófilas (que surgiram várias vezes no grupo),  
4 falenófilas e psicófilas.

5

### 6 ***Morfologia e biologia floral***

7

8 As descrições morfológicas foram feitas a partir de observação de material fresco  
9 e fixado. Os dados morfológicos não disponíveis no material foram obtidos das obras de  
10 Hoehne (1945) e de Azevedo *et al.* (2014). Para a dimensão das peças florais, foram  
11 utilizados valores médios de duas a três flores por indivíduo (Tabela 2). As imagens foram  
12 obtidas utilizando câmera Nikon D90 para fotos macro, e câmera SC30 acoplada a lupa  
13 Olympus SZX7 com o programa analySIS getIT! para imagens obtidas em  
14 estereomicroscópio.

15

### 16 ***Microscopia de luz***

17

18 Embora existam relatos da presença de osmóforos nas sépalas e nas pétalas laterais  
19 de orquídeas, em Spiranthinae todos os registros em literatura indicam o labelo como a  
20 peça floral que costuma apresentar nectários e osmóforos, e o exame de material fresco  
21 das partes florais das espécies estudadas confirmam esta sugestão. Assim, considerando  
22 que as sépalas e demais pétalas não parecem ter estrutura secretora neste grupo, as  
23 análises anatômicas foram restritas ao labelo.

24

25 Amostras de labelo coletadas de flores em antese foram fixadas em solução de  
26 Karnovsky (Karnovsky, 1965) e posteriormente desidratadas em série etanólica e  
27 incluídas em 2-hidroxietil-metacrilato (Historesin, Leica). Seções transversais e  
28 longitudinais com 6µm de espessura foram obtidas em micrótomo rotativo (Hyrax M40,  
29 Zeiss), coradas com azul de toluidina em tampão fosfato pH 6,8 (O'Brien *et al.*, 1964) e  
30 montadas com resina sintética (Entellan, Sigma). Secções do material fixado foram  
31 submetidas ao reagente de Lugol (Johansen, 1940) para observação de amido; Sudan red  
32 B para detecção de lipídios em geral (Brundett *et al.* 1991) e solução aquosa de vermelho  
33 de rutênio a 0,02% para detecção de substâncias pécticas (Jensen 1962). As imagens  
foram obtidas em câmera fotográfica digital e microcomputador com o programa de

1 captura de imagens Leica Application Suite LAS EZ acoplados a um microscópio de luz  
2 (Leica ICC50 HD). Dados anatômicos de *Cotylolabium lutzii* foram compilados de Borba  
3 *et al.* (2014).

#### 4 5 ***Microscopia eletrônica de varredura (MEV)***

6  
7 Amostras do labelo das flores de *Cotylolabium lutzii*, *Cranichis candida*,  
8 *Cyclopogon elatus*, *Lankesterella ceracifolia*, *Mesadenella cuspidata*, *Pelexia*  
9 *pterygantha*, *Sacoila lanceolata* e *Sauroglossum elatum* foram utilizadas para as análises  
10 de micromorfologia. A amostragem destas espécies teve por objetivo contemplar pelo  
11 menos uma espécie para cada síndrome de polinização descrita no grupo.

12 As amostras foram fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965),  
13 desidratadas em série etanólica e levadas à secagem em ponto crítico de CO<sub>2</sub> (Robards,  
14 1978). Após a fixação das amostras nos stubs, foi realizada a deposição metálica com  
15 ouro. A observação e a captura de imagens foram realizadas em microscópio eletrônico  
16 de varredura (Quanta 200, FEI Company).

#### 17 18 ***Microscopia eletrônica de transmissão (MET)***

19  
20 Para as análises ultraestruturais foram utilizados labelos de flores das seguintes  
21 espécies: *Cyclopogon elatus*, *Mesadenella cuspidata*, *Pelexia pterygantha*, *Sacoila*  
22 *lanceolata* e *Sauroglossum elatum*. Secções transversais (1mm) foram fixadas em solução  
23 de Karnovsky (Karnovsky, 1965), pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% em tampão  
24 fosfato 0,1 M e incluídas em resina epóxi (Spurr, Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA)  
25 (Roland, 1978). Seções ultrafinas (60 nm), obtidas em ultramicrotomo (UC6, Leica  
26 Microsystems Inc., Deerfield, EUA), foram contrastadas com acetato de uranila (Watson,  
27 1958) e citrato de chumbo (Reynolds, 1963). A observação e obtenção das imagens foram  
28 realizadas em microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2–Spirit (Philips/FEI  
29 Company, Eindhoven, Holanda).

#### 30 31 ***Análise morfométrica multivariada***

1 Foi realizada uma análise morfométrica multivariada para verificar a existência  
2 de relação entre síndromes de polinização e similaridade anatômica ou morfológica das  
3 espécies. Foi construída uma matriz com 45 caracteres das 17 espécies estudadas, sendo  
4 27 destes caracteres anatômicos (10 quantitativos e 17 binários - presença e ausência) e  
5 18 caracteres macro-morfológicos (13 quantitativos, 4 binários e 1 qualitativo -  
6 multiestado não ordenado) (Tabela 2). Três matrizes de similaridade (caracteres  
7 anatômicos e morfológicos agrupados, apenas os caracteres anatômicos e apenas os  
8 caracteres morfológicos) foram calculadas utilizando o coeficiente de Gower (1971), que  
9 leva em consideração a presença de diferentes tipos de variáveis (quantitativas, binárias  
10 e multiestado), utilizando o software Fitopac 2.1 (Shepherd, 2010). Análises de  
11 agrupamento foram realizadas utilizando UPGMA como algoritmo de agrupamento.

12

### 13 *Otimização de caracteres estruturais*

14

15 Foi construída uma árvore filogenética das espécies estudadas através de análises  
16 de sequências de DNA nuclear (região ITS) e plastidial (regiões matK-trnK e trnL-trnF)  
17 obtidas em um estudo prévio (Salazar *et al.*, no prelo). Em alguns casos não havia  
18 sequências de DNA disponíveis da espécie exata estudada anatomicamente, sendo  
19 utilizadas no seu lugar sequências da espécie congênica taxonomicamente mais  
20 próxima (p. ex., *Pelexia orobanchoides* no lugar de *P. pterygantha*). A análise  
21 filogenética de parcimônia foi realizada com o programa PAUP\* para Windows 32 bits  
22 (Swofford 2017), resultando em apenas uma árvore mais parcimoniosa.

23 Para examinar possíveis cenários da evolução dos caracteres anatômicos, estes  
24 foram incorporados em uma matriz de dados no programa Mesquite versão 3.11  
25 (Maddison & Maddison, 2017) e importados na árvore obtida das análises de sequências  
26 de DNA. Os caracteres anatômicos foram otimizados na referida árvore mediante o  
27 critério de "estados ancestrais – parcimônia", ou seja, se reconstruíram os estados  
28 ancestrais dos caracteres que implicam no menor número possível de mudanças.

29

30

## 31 **RESULTADOS**

32

### 33 *Morfologia floral*

34

1           *Beloglottis mexicana*: flores de 4 a 5mm compr. (ovário + perianto), ressupinadas  
2 (labelo em posição inferior por torção de 180° do pedicelo), multiflora, em disposição  
3 espiralada, sépalas e pétalas parcialmente eretas formando um tubo curto, membranáceas,  
4 peças do perianto brancas com venação central amarronzada, pubescente na superfície  
5 mais externa com pelos glandulares. Sépala dorsal conivente com as pétalas, 3 x 3mm,  
6 oblonga, ápice obtuso. Sépalas laterais 4 x 2mm, oblongas, ápice obtuso, base fundida  
7 com a base do labelo e pé da coluna formando uma cavidade nectarífera 1,5-2 x 1,5-2mm,  
8 decurrente com a coluna e patente com o ovário. Pétalas 4 x 1,5mm, oblongas, ápice  
9 obtuso. Labelo com margens parcialmente envolvendo coluna, 3 x 2mm, oblongo,  
10 carnoso, terço distal patente, ápice obtuso papiloso, base com duas aurículas de 1-1,5mm  
11 compr., oblongas, carnosas (Figura 2A-C).

12           *Cranichis candida*: flores de 4.5-5mm compr. (ovário + perianto), não  
13 ressupinadas (labelo em posição superior), multiflora, em disposição espiralada, sépalas  
14 e pétalas patente a reflexas, membranáceas, glabras, brancas com ápice esverdeado.  
15 Sépala dorsal 3-4 x 1mm, oblonga, ápice obtuso. Sépalas laterais de igual compr. da  
16 sépala dorsal, 1-2mm de largura, ovaladas, ápice obtuso. Pétalas 2-3 x 1mm, oblongas,  
17 ápice obtuso. Labelo branco com pontos e linhas verdes na face adaxial, 2-3 x 1-2mm,  
18 carnoso, elíptico-arredondado, conchiforme, com calosidades entre meio e bordo,  
19 margens laterais sinuosas e levemente patentes, base subcordada (Figura 4J, M).

20           *Cyclopogon chloroleucus*: flores de 10 a 12mm compr. (ovário + perianto),  
21 ressupinadas, laxamente 10-12-floro, em disposição espiralada, sépalas e pétalas  
22 parcialmente eretas formando um tubo curto, membranáceas, pubescente na superfície  
23 mais externa com pelos glandulares. Sépala dorsal verde escuro, conivente com as pétalas,  
24 4-5 x 2mm, oblonga, ápice agudo. Sépalas laterais verde claras com o ápice  
25 esbranquiçado, 4-5 x 2mm, oblongas, ápice agudo, base fundida com a base do labelo e  
26 pé da coluna formando uma cavidade nectarífera 1,5-2 x 1,5-2mm decurrente com a  
27 coluna e patente com o ovário. Pétalas verde esbranquiçadas, 3-4 x 1-1,5mm, oblongas,  
28 ápice agudo. Labelo verde com terço apical branco com linhas amarronzadas transversais  
29 na face adaxial, margens parcialmente envolvendo coluna, 5-6 x 3mm, oblongo, terço  
30 apical obcordiforme, carnoso, ápice levemente reflexo, base com duas aurículas de 1mm  
31 ou menos compr., cônicas, carnosas, ligeiramente projetadas para o centro do labelo  
32 (Figura 2G-I).

1           *Cyclopogon elatus*: flores de 10 a 12mm compr. (ovário + perianto), ressupinadas,  
2 multiflora, em disposição espiralada, peças do perianto eretas conferindo um aspecto  
3 tubular, membranáceas, sépalas pubescentes da base ao terço mediano. Sépala dorsal  
4 verde, conivente com as pétalas, 5,5-6 x 2mm, oblongas, terço distal levemente patente,  
5 ápice levemente acuminado. Sépalas laterais verde-esbranquiçadas, 5-6 x 1-2mm,  
6 lineares, ápice agudo, base fundida com a base do labelo e pé da coluna formando uma  
7 cavidade nectarífera 2 x 2mm decurrente com a coluna e patente com o ovário. Pétalas  
8 branco-esverdeadas, 5 x 1mm, linear-oblongas, mais curtas que a sépala dorsal, ápice  
9 obtuso, glabras. Labelo branco com terço mediano esverdeado, margens parcialmente  
10 envolvendo coluna, 7-10 x 2mm, oblongo de ápice orbicular com margem sinuosa, base  
11 com duas aurículas, 1-2 mm compr., cônicas, carnosas, ligeiramente projetadas para o  
12 centro do labelo (Figura 2D-F).

13           *Dichromanthus cinnabarinus*: flores de 20 a 21mm compr. (ovário + perianto),  
14 ressupinadas, multiflora, em disposição espiralada, sépalas e pétalas parcialmente eretas  
15 formando um tubo, membranáceas, pubescente na superfície mais externa. Sépala dorsal  
16 alaranjada, conivente com as pétalas, 8-13 x 2-3mm, linear-lanceolada, terço distal  
17 patente, ápice agudo. Sépalas laterais amarelo-alaranjadas 9-13 x 2mm, linear-  
18 lanceoladas, terço distal patente, ápice agudo, base fundida com a base do labelo e pé da  
19 coluna formando uma cavidade nectarífera 2-3 x 1-1,5mm, decurrente com a coluna e  
20 com o ovário. Pétalas amarelo-alaranjadas, 10-13 x 1,5-2mm, linear-lanceoladas, terço  
21 distal patente, ápice agudo. Labelo amarelo de ápice alaranjado, com margens  
22 parcialmente envolvendo coluna, 15-16 x 2mm, linear-lanceolado, carnoso, terço distal  
23 patente, ápice agudo, base com duas aurículas de 1-2.5mm compr., oblongas, carnosas  
24 (Figura 2J-L).

25           *Eltroplectris triloba*: flores de 17 a 27mm compr. (ovário + perianto),  
26 ressupinadas, laxiflora, em disposição espiralada, membranáceas, ovário pubescente e  
27 peças do perianto glabras. Sépala dorsal verde, conivente com as pétalas, 9-12 x 3-4mm,  
28 parcialmente ereta, terço distal patente, oval, ápice aguçado. Sépalas laterais verdes, 12-  
29 16 x 1-2mm, linear-lanceoladas, eretas, ápice acuminado, base fundida com a base do  
30 labelo e pé da coluna formando uma cavidade nectarífera 9-15 x 2mm patente com a  
31 coluna e decurrente com o ovário. Pétalas verdes, 9-10 x 3-4mm, falciformes,  
32 parcialmente eretas, ápice acuminado. Labelo verde-esbranquiçado, terço distal patente,  
33 margens parcialmente envolvendo coluna, 12-17 x 2-3mm, linear-oblongo, carnoso, ápice

1 aguçado, base com duas aurículas de 3-4mm compr., cônicas, carnosas, ligeiramente  
2 projetadas para o centro do labelo (Figura 2M-O).

3 *Lankesterella ceracifolia*: flores de 9-12mm compr. (ovário + perianto),  
4 ressupinadas, 2-6 flores, secundas, peças do perianto eretas conferindo um aspecto  
5 tubular, membranáceas, pubescente na superfície mais externa, perianto branco. Sépala  
6 dorsal branco a esverdeada, conivente com as pétalas, 6-7 x 2-3mm, terço distal patente,  
7 linear-lanceolada, ápice obtuso. Sépalas laterais 5-7 x 2mm, linear-lanceoladas, ápice  
8 agudo levemente patente, base fundida com a base do labelo e pé da coluna formando  
9 uma cavidade nectarífera 4-5 x 2mm decurrente com a coluna e ligeiramente patente com  
10 o ovário. Pétalas 4.5-6 x 1-2mm, oblongas, ápice obtuso ligeiramente patente. Labelo com  
11 venação esverdeada, acanoadado, margens parcialmente envolvendo coluna, 8-10 x 2-3mm,  
12 oblongo-obovado, ápice orbicular com margem sinuosa, base com duas aurículas de 1-  
13 3mm compr., não-contínuas, carnosas (Figura 3A-C).

14 *Mesadenella cuspidata*: flores de 6 a 8mm compr. (ovário + perianto),  
15 ressupinadas, multiflora, em disposição espiralada, sépalas e pétalas parcialmente eretas  
16 formando um tubo curto, membranáceas, pubescente na superfície mais externa, sem odor  
17 aparente. Sépalas com base verde-amarronzado e ápice branco, ovadas a oblongas, ápice  
18 agudo. Sépala dorsal conivente com as pétalas, 5-6 x 1-2mm. Sépalas laterais, 4-5,5 x  
19 1,5-2mm, levemente patentes, base fundida com a base do labelo e pé da coluna formando  
20 uma cavidade nectarífera 1,5-2 x 1mm, patente com a coluna e decurrente com o ovário.  
21 Pétalas brancas, 4 x 1-1,5mm, oblongas, ápice agudo, papilosas. Labelo branco no ápice  
22 e na base e amarelo no terço mediano, margens parcialmente envolvendo coluna, 4-6 x  
23 1-2mm, oblongo, carnoso, terço distal patente, ápice agudo muito papiloso, base com  
24 duas aurículas brancas, 1,5mm ou menos compr., cônicas, carnosas, ligeiramente  
25 projetadas para o centro do labelo (Figura 3D-F).

26 *Pelexia pterygantha*: flores de 18 a 21mm compr. (ovário + perianto),  
27 ressupinadas, bastamente multiflora, em disposição espiralada, membranáceas, sépalas e  
28 pétalas eretas, pubescente na superfície mais externa com pelos glandulares. Sépala dorsal  
29 verde, conivente com as pétalas, 11-14 x 6-7mm, oblonga, ápice acuminado. Sépalas  
30 laterais verdes, 11-12 x 2-3mm, falciformes, ápice agudo, base fundida com a base do  
31 labelo e pé da coluna formando uma cavidade nectarífera 3-5 x 3-4mm patente com a  
32 coluna e decurrente com o ovário. Pétalas verdes, 10-13 x 3-4mm, linear-oblongas, ápice  
33 agudo. Labelo de base verde, terço mediano amarelo e terço apical branco com venação

1 verde, canaliculado, margens parcialmente envolvendo coluna, 15-17 x 4-5mm, oblongo,  
2 carnosos, ápice patente-reflexo papiloso, base com duas aurículas 2-4 x 1-1,5mm, cônicas,  
3 carnosas, ligeiramente projetadas para o centro do labelo (Figura 3G-I).

4 *Prescottia glazioviana*: flores de 6.5-8mm compr. (ovário + perianto), não  
5 ressupinadas, multiflora, em disposição espiralada, peças do perianto eretas conferindo  
6 um aspecto tubular, verdes, membranáceas, glabras. Sépala dorsal 3-4 x 1-2mm, oblonga,  
7 reflexa, ápice obtuso a agudo. Sépala lateral 4-5 x 1,5-2mm, oblongas, coniventes ao  
8 labelo, ápice obtuso a agudo. Pétalas 3-4 x 1mm, lineares, coniventes ao labelo, ápice  
9 obtuso esbranquiçado. Labelo 3,5-4 x 3-4mm, margens parcialmente adnadas à lateral da  
10 coluna, fortemente cuculado, carnosos, ápice muito papiloso com margem sinuosa, base  
11 com duas aurículas de 1mm ou menos compr., arredondadas, carnosas (Figura 4K, N).

12 *Prescottia oligantha*: flores de 3 a 4mm compr. (ovário + perianto), não  
13 ressupinadas, laxamente multiflora, em disposição espiralada, peças do perianto eretas  
14 conferindo um aspecto tubular, brancas, membranáceas, glabras. Sépala dorsal 1-1,9 x  
15 0,8-1,1mm, triangular a ovada, reflexa, ápice agudo de cor arroxeada. Sépala lateral  
16 1,5-2,5 x 0,9-1,5mm, ovadas a oblongas, patentes a reflexas, ápice agudo de cor  
17 arroxeada. Pétalas 1-2 x 0,5-0,7mm, lineares, reflexas, ápice agudo a obtuso. Labelo 1,5-  
18 2,5 x 2-2,3mm, margens parcialmente adnadas à lateral da coluna, fortemente cuculado,  
19 carnosos, face adaxial pilosa, base com duas aurículas de 1mm ou menos compr.,  
20 arredondadas, carnosas (Figura 4L, O).

21 *Pteroglossa roseo-alba*: flores de 37 a 40mm compr. (ovário + perianto),  
22 ressupinadas, multiflora, em disposição espiralada, membranáceas, pelos esparsos na  
23 superfície mais externa. Sépala dorsal branca, conivente com as pétalas, 18-21 x 5-6, terço  
24 distal levemente patente, oblonga, ápice agudo. Sépala lateral branca a rosada, 17-21  
25 x 6-7mm, oblongo-lanceoladas, patentes, ápice agudo, base fundida com a base do labelo  
26 e pé da coluna formando uma cavidade nectarífera 16-19 x 2-3mm patente com a coluna  
27 e decorrente com o ovário. Pétalas brancas com traços rosados na face adaxial, 14-18 x  
28 3-6mm, oblongo-lanceoladas, ápice agudo. Labelo branco com traços rosados na face  
29 adaxial, margens parcialmente envolvendo coluna, 20-26 x 5mm, ovada, terço distal  
30 levemente patente, carnosos, ápice muito papiloso com margem sinuosa, base com duas  
31 aurículas 2-4mm compr., lineares, carnosas (Figura 3J-L).

32 *Sacoila lanceolata*: flores de 24 a 30mm compr. (ovário + perianto), ressupinadas,  
33 multiflora, em disposição espiralada, peças do perianto eretas conferindo um aspecto

1 tubular, membranáceas, pubescente na superfície mais externa com pelos glandulares,  
2 sem odor aparente, sépalas e pétalas rosadas. Sépala dorsal conivente com as pétalas, 17-  
3 18 x 5-7, lanceolada, ápice agudo. Sépalas laterais 14-17 x 3,5-4mm, linear-lanceoladas,  
4 ápice agudo, base fundida com a base do labelo e pé da coluna formando uma cavidade  
5 nectarífera 5,5-7 x 3-4mm decurrente com a coluna e o ovário. Pétalas 13-14 x 5mm,  
6 linear-falciformes, ápice agudo, glabras. Labelo rosado-esbranquiçado, margens  
7 parcialmente envolvendo coluna, 15-18 x 3mm, oblongo, terço distal levemente patente,  
8 ápice agudo, base com duas aurículas brancas, 2,5-4mm compr., lineares, carnosas  
9 (Figura 3M-O).

10 *Sarcoglottis fasciculata*: flores de 37 a 39mm compr. (ovário + perianto),  
11 ressupinadas, laxamente multiflora, em disposição espiralada, peças do perianto eretas  
12 conferindo um aspecto tubular, membranáceas, pubescente na superfície mais externa.  
13 Sépala dorsal acobreada clareando na base, com nervuras de coloração mais escura,  
14 conivente com as pétalas, 15-16 x 4-5mm, oblonga-lanceolada, terço distal levemente  
15 patente, ápice agudo. Sépalas laterais acobreadas com nervuras de coloração mais escura,  
16 16-18 x 4-6mm, falciformes, levemente patentes, ápice agudo, base fundida com a base  
17 do labelo e pé da coluna formando uma cavidade nectarífera, 6-7mm compr., patente com  
18 a coluna e decurrente com o ovário. Pétalas acobreadas, 15-18 x 3mm, linear-lanceoladas,  
19 ápice agudo. Labelo esbranquiçado escurecendo acobreado, terço distal com nervuras  
20 esverdeadas, margens parcialmente envolvendo coluna, 22-23 x 5-6mm, oblongo-  
21 lanceolado, carnoso, ápice papiloso com margem sinuosa, base com duas aurículas 5-6 x  
22 1mm, lineares, carnosas (Figura 4A-C).

23 *Sauroglossum elatum*: flores de 12 a 15mm compr. (ovário + perianto),  
24 ressupinadas, bastante multiflora, em disposição espiralada, peças do perianto eretas  
25 conferindo um aspecto tubular, membranáceas, pubescente na superfície mais externa,  
26 com odor adocicado mais forte no início da noite. Sépala dorsal verde, conivente com as  
27 pétalas, 6-10 x 2-3mm, oblonga-obovada, ápice agudo. Sépalas laterais verde-  
28 esbranquiçadas, 8-9 x 1-3mm, oblongo-obovadas, levemente patentes e arqueadas, ápice  
29 agudo, base fundida com a base do labelo e pé da coluna formando uma cavidade  
30 nectarífera 1-2 x 1-2mm patente com a coluna e decurrente com o ovário. Pétalas brancas,  
31 de igual compr. da sépala dorsal, 1-2mm de largura, linear-obovadas, ápice agudo. Labelo  
32 branco, fortemente canaliculado, margens parcialmente envolvendo coluna, 7-10 x 3mm,  
33 oblongo na região mediana, terço distal conchiforme, carnoso, ápice muito papiloso com



1 margem sinuosa e reflexa, base com duas aurículas de 1mm ou menos compr., cônicas,  
2 carnosas, ligeiramente projetadas para o centro do labelo (Figura 4D-F).

3 *Skeptrostachys balanophorostachya*: flores de 12 a 15mm compr. (ovário +  
4 perianto), ressupinadas, multiflora, em disposição espiralada, sépalas e pétalas  
5 parcialmente eretas formando um tubo curto, membranáceas, pubescente na superfície  
6 mais externa com pelos glandulares. Sépala dorsal verde, conivente com as pétalas, 9-11  
7 x 3-4mm, oblonga, ápice obtuso. Sépalas laterais verdes, 7-9 x 2-3mm, oblongas, ápice  
8 obtuso, base fundida com a base do labelo e pé da coluna formando uma cavidade  
9 nectarífera 3-4.5 x 1,5-2mm, patente com a coluna e decorrente com o ovário. Pétalas  
10 brancas, 10-11 x 3-4mm, oblongas, ápice obtuso. Labelo branco, margens parcialmente  
11 envolvendo coluna, 8-10 x 2-3mm, oblongo, carnososo, terço distal patente, ápice obtuso  
12 papiloso, base com duas aurículas de 1-2,5mm compr., oblongas, carnosas (Figura 4G-I).

13

#### 14 ***Análises estruturais***

15

16 Nas espécies de Spiranthinae estudadas o labelo apresenta epiderme unisseriada,  
17 desprovida de estômatos e formada por células justapostas. A cutícula é conspícua e  
18 delgada. Tricomas simples e papilas foram observados na maioria das espécies, estando  
19 relacionados à atividade secretora em diversas porções do labelo, enquanto em outras  
20 mostraram-se não glandulares. Na maioria das espécies, as aurículas no terço basal do  
21 labelo apresentam epiderme secretora voltada para a face adaxial, com células cuboides  
22 de citoplasma denso e núcleo conspícuo (Figura 5A). Nesta porção, a epiderme secretora  
23 apresenta um relevo plano a ligeiramente ondulado, exceto em *P. roseo-alba*, *S. elatum* e  
24 *L. ceracifolia*, que apresentam a epiderme secretora papilosa (Figura 5B).

25

26 Algumas espécies apresentam tricomas na face adaxial do labelo, próximo à região  
27 secretora disposta no terço basal. Esses tricomas podem ser não glandulares, como em *M.*  
28 *cuspidata* e *D. cinnabarinus*, e/ou glandulares, como em *C. elatus*, e se estender até a  
29 região diretamente abaixo do estigma (Figura 5C). Outras espécies não possuem tricomas  
30 na face adaxial próximo às aurículas, somente próximo ao estigma, como por exemplo *S.*  
31 *lanceolata*. Em *P. roseo-alba* e *C. chloroleucus* não foram encontrados tricomas nessa  
32 região do labelo próxima ao estigma e à coluna, apenas na coluna em si (Figura 5E). As  
margens do labelo são adnatas à lateral da coluna, não apresentando fusão tecidual.

1 Ainda na face adaxial, as células epidérmicas ordinárias ou padrão apresentam  
2 grande diversidade no terço médio do labelo, podendo apresentar atividade secretora,  
3 como em *C. chloroleucus* (Figura 5E-F), ou não como em *B. mexicana*. A presença de  
4 tricomas simples, unicelulares, não glandulares foi observada em *P. roseo-alba* e em *E.*  
5 *triloba*, sendo nesta espécie observados na forma de papilas. Os tricomas glandulares, na  
6 forma de tricomas simples como em *M. cuspidata*, ou na forma de papilas, como em *C.*  
7 *elatus*, mostraram-se de ocorrência mais restrita, quando comparados àqueles não  
8 glandulares (Figura 5D). Os tricomas são unicelulares, alongados e as papilas apresentam  
9 formato globoso ou cônico. No terço médio do labelo, *S. lanceolata* e *S. elatum* não  
10 apresentaram nenhum tipo de papila ou tricoma na face adaxial, sendo a epiderme de  
11 relevo plano a levemente ondulado.

12 No terço apical do labelo, a maioria das espécies analisadas apresentam muitas  
13 papilas na face adaxial, as quais, em sua maioria, não estão envolvidas em atividade  
14 secretora, sendo não glandulares, como em *M. cuspidata* (Figura 6A). Entretanto, em  
15 algumas espécies, como *C. chloroleucus* e *B. mexicana*, as papilas são glandulares (Figura  
16 6B). Algumas poucas espécies, como *S. fasciculata*, não possuem papilas nessa região e  
17 apresentam a epiderme glabra e com relevo plano.

18 A epiderme, na face abaxial do labelo, apresenta inúmeros tricomas unicelulares  
19 alongados e/ou papilas, densamente aglomerados, exceto em *B. mexicana*. Em *L.*  
20 *ceracifolia* esses tricomas estão restritos à região onde a face adaxial é ocupada com  
21 tecido secretor, ou seja, no terço basal. No terço médio do labelo algumas espécies  
22 apresentam na epiderme células globosas, bastante volumosas, de citoplasma denso e  
23 núcleo grande (Figura 6C). Estas células foram encontradas em *C. lutzii*, *C. elatus*, *L.*  
24 *ceracifolia*, *P. pterygantha* e *S. elatum*. Em *C. elatus* e *L. ceracifolia* estas células se  
25 estendem da base até o terço médio do labelo, porém na última essas células só aparecem  
26 onde termina a porção tricomatosa. No terço apical do labelo papilas também estão  
27 presentes na face abaxial na maioria das espécies, sendo notável a quantidade de grãos de  
28 amido detectada nelas em *P. pterygantha* e *C. chloroleucus*. Amido também foi detectado  
29 na epiderme de *P. roseo-alba* e *C. elatus*.

30 O mesofilo do labelo destas flores, à exceção da região das aurículas, é homogêneo,  
31 composto por células parenquimáticas com vacúolos grandes, globosas, distribuídas de  
32 modo compacto, deixando pequenos espaços intercelulares. A espessura do mesofilo  
33 varia com cada espécie, sendo que o labelo é normalmente mais carnoso que as demais

1 peças do perianto. Idioblastos com ráfides de oxalato de cálcio estão distribuídos ao acaso  
2 dentre as células parenquimáticas do mesofilo (Figura 6B, detalhe). Estes idioblastos,  
3 embora raramente, são observados também na porção secretora das aurículas, como em  
4 *P. pterygantha*. Em *C. chloroleucus*, *D. cinnabarinus*, *E. triloba*, *M. cuspidata* e *S.*  
5 *fasciculata*, foi detectada a presença de grãos de amido no mesofilo.

6 No labelo de *S. fasciculata* o mesofilo difere do padrão observado nas demais  
7 espécies, por não se apresentar homogêneo. Neste caso, as células do mesofilo voltadas  
8 para a face adaxial do labelo são pequenas, vacuoladas e dispostas de modo compacto,  
9 deixando pequenos espaços intercelulares, enquanto as células do mesofilo próximas à  
10 face abaxial do labelo seguem a mesma forma e distribuição aleatória do mesofilo do  
11 restante das espécies (Figura 6D). Essas células também apresentaram grande quantidade  
12 de amido, que foi encontrado em menor quantidade no mesofilo próximo à face adaxial.

13 No mesofilo das aurículas observou-se um parênquima secretor, cuja espessura  
14 mostrou-se variável entre as espécies estudadas, podendo se estender desde quatro  
15 camadas dispostas na face adaxial (Figura 6E) até ocupar todo o mesofilo, este último  
16 observado em *S. fasciculata* (Figura 6F). Em todas as espécies estudadas o parênquima  
17 secretor apresenta células com núcleo volumoso e citoplasma denso, com pequenos  
18 vacúolos. Nas células secretoras a presença de grãos de amido foi marcante na maioria  
19 das espécies.

20 Em todas as espécies analisadas, essa porção secretora mostrou-se bem  
21 vascularizada. Os feixes vasculares são colaterais, com a presença de muitas células  
22 parenquimáticas e poucos elementos traqueais no xilema, e dispostos na região mediana  
23 do mesofilo. Esses mesmos tipos de feixes são encontrados no restante do mesofilo do  
24 labelo, não tendo variação com os encontrados na porção secretora. Na maioria das  
25 espécies os feixes vasculares delimitam a região do tecido secretor e emitem projeções,  
26 sobretudo ricas em elementos floemáticos, que se estendem por entre as células do  
27 parênquima secretor. O número de feixes pode variar de um a 10, dependendo da espécie  
28 (Figura 6E).

29 Assim como observado nas *Spiranthinae*, as espécies de *Cranichidinae* estudadas  
30 apresentam labelo de epiderme uniseriada, desprovida de estômatos e formada por células  
31 justapostas. Ambas as espécies de *Prescottia* apresentam epiderme secretora em suas  
32 aurículas, com células cuboides de citoplasma denso e núcleo conspícuo (Figura 7B). O  
33 labelo de *C. candida* difere daquele observado nas demais espécies, pois possui epiderme

1 secretora em mais de 50% de sua face adaxial, compreendendo toda a porção basal, à  
2 exceção das margens, e não apenas em aurículas na base do labelo (Figura 7A). Tricomas  
3 simples não glandulares estão presentes na face adaxial no terço médio do labelo de *P.*  
4 *oligantha*, enquanto *P. glazioviana* possui a face adaxial glabra.

5 A face abaxial do labelo de *C. candida* e *P. oligantha* apresenta células globosas,  
6 bastante volumosas, de citoplasma denso e núcleo volumoso, sendo potencialmente  
7 secretoras, muito similares às encontradas em algumas espécies de Spiranthinae (Figura  
8 7A). Papilas não glandulares estão presentes por toda a face abaxial do labelo de *P.*  
9 *glazioviana* (Figura 7C).

10 Em *Prescottia*, na região das aurículas, o parênquima secretor, ocupa todo o  
11 mesofilo, cuja espessura varia de três a 10 camadas de células (Figura 7B). Em *C. candida*  
12 o parênquima secretor acompanha a epiderme secretora em toda sua extensão, tendo  
13 normalmente uma ou duas camadas de espessura, mas podendo chegar a sete camadas na  
14 região das calosidades (Figura 7A). De modo similar ao encontrado nas Spiranthinae, o  
15 mesofilo apresenta feixes vasculares colaterais.

16

### 17 **Análises micromorfológicas**

18

19 Análises em microscopia eletrônica de varredura mostram que a base do labelo das  
20 espécies de Spiranthinae apresenta grande quantidade de tricomas e/ou papilas na face  
21 abaxial próximo à região das aurículas, algumas vezes mais densos e longos (p.ex., *S.*  
22 *lanceolata*), ou mais curtos e esparsos (p.ex., *S. elatum*). *C. lutzii* não apresenta aurículas,  
23 mas possui um epitélio secretor como o encontrado nas outras Spiranthinae. *L. ceracifolia*  
24 apresenta as aurículas segmentadas em cinco projeções, e a epiderme é papilosa, sendo  
25 consideravelmente distinta daquela observada nas outras espécies (Figura 8A-B).

26 Na face abaxial do labelo, as células ordinárias da epiderme são intercaladas com  
27 células volumosas, globulares e muito distintas, que podem apresentar forma elíptica  
28 (p.ex., *C. elatus*), ovalada (*P. pterygantha*) ou não possuir formato definido (*C. candida*).  
29 Essas células volumosas ocorrem da base até a região mediana do labelo em *C. candida*,  
30 *C. elatum* e *P. pterygantha*, da região mediana até o ápice em *S. elatum*, e somente na  
31 região mediana em *C. lutzii*. Estas células podem estar isoladas e em distribuição aleatória  
32 pelo labelo (Figura 8C) ou formar pequenos agrupamentos (Figura 8D). A superfície

1 nessas células é lisa e sem ornamentações, exceto em *C. candida*, e a superfície das  
2 células ordinárias da epiderme em todas as espécies é estriada.

3 No labelo de *C. candida*, a face adaxial apresenta dois calos evidentes entre o meio  
4 e o bordo, os quais possuem epiderme secretora e não apresenta aurículas como nas  
5 *Spiranthinae*. As células secretoras exibem estrias evidentes, usualmente organizadas em  
6 um padrão circular (Figura 8E). Na face secretora, observou-se a formação de extensas  
7 bolsas subcuticulares na região mediana destas células; tais bolsas formam projeções  
8 alongadas, conferindo à superfície um aspecto tricomatoso (Figura 8F).

9 No labelo de *C. lutzii*, *C. elatus*, *L. ceracifolia* e *S. elatum* os tricomas apresentam  
10 cutícula com estrias bem delimitadas, enquanto que em *P. pterygantha* e *S. lanceolata*  
11 essas estrias são menos evidentes. Nas espécies de *Spiranthinae* estudadas, o labelo  
12 apresenta ápice bastante papiloso, enquanto o de *C. candida* não apresenta papilas.

### 14 ***Análises ultraestruturais***

15  
16 As células globosas encontradas na epiderme da face abaxial do labelo em  
17 *Spiranthinae* possuem, em geral, citoplasma denso rico em mitocôndrias, as quais exibem  
18 cristas bem desenvolvidas, e numerosos segmentos de retículo endoplasmático e  
19 vesículas dispersos pela matriz citoplasmática (Figura 9A-D). Plastídios com formato  
20 irregular também estão presentes em abundância, sendo frequentemente conspícuos, com  
21 sistema de membranas interno pouco desenvolvido e estroma denso (Figura 9 C). No  
22 parênquima subjacente, observou-se a presença de plastídios com grande quantidade de  
23 grãos de amido acumulados no estroma, assim como pequenas inclusões de material  
24 osmiofílico (Figura 9E-F). Plastídios também podem ser observados em associação com  
25 segmentos de retículo endoplasmático (Figura 9E-F). O aparelho de Golgi é pouco  
26 desenvolvido, apresentando poucos dictiossomos, os quais são inconspícuos e pouco  
27 ativos (Figura 9A-B, E-F). Plasmodesmos foram observados estabelecendo conexões  
28 citoplasmáticas entre células adjacentes (Figura 9F).

29 Assim como aquelas descritas acima, as células do tecido secretor presentes no  
30 terço basal do labelo possuem citoplasma denso, rico em mitocôndrias, vesículas e  
31 segmentos de retículo endoplasmático (Figura 10A-F). Nessas células o núcleo é grande  
32 e com nucléolos conspícuos (Figura 10A, E). Inúmeros plastídios são observados  
33 dispersos na matriz citoplasmática, também com estroma denso, sistema de membranas

1 interno pouco desenvolvido e inclusões de material osmiofílico (Figura 10A-B, E). Em  
2 alguns plastídios foi observada a presença de grãos de amido acumulados no estroma  
3 (Figura 10A, E). O aparelho de Golgi é igualmente pouco ativo, com raros dictiossomas  
4 dispersos pela matriz citoplasmática (Figura 10B). Foram observadas evidências de fusão  
5 entre vesículas e a membrana plasmática (Figura 10C), assim como secreção acumulada  
6 no espaço subcuticular (Figura 10C) e periplasmático (Figura 10D).

### 9 ***Análise morfométrica multivariada***

10  
11 No dendrograma construído a partir da matriz com todos os caracteres há poucos  
12 grupos bem definidos, em função da baixa similaridade geral entre as espécies (Figura  
13 11). Pode ser visualizado um grande encadeamento de pequenos grupos contendo cerca  
14 de três espécies, de forma que a relação entre eles não é estável. Assim, conclusões mais  
15 amplas a respeito destas relações podem ser espúrias. Mas alguns agrupamentos merecem  
16 ser destacados. Uma primeira divisão no dendrograma separa todas as espécies de  
17 *Spiranthinae* em um grupo, enquanto as espécies de *Cranichidinae* (*Prescottia* e  
18 *Cranichis*) constituem um grupo distinto. Este grupo de *Cranichidinae* é caracterizado  
19 pelas flores não ressupinadas e de tamanho muito reduzido, também apresentando os  
20 menores nectários e cavidade nectarífera (quando presentes). Devido a essas  
21 características morfológicas, este grupo aparece bem definido na análise utilizando a  
22 matriz com apenas os caracteres morfológicos, porém não é recuperado na análise  
23 utilizando apenas os caracteres anatômicos, apresentando similaridade muito baixa entre  
24 as três espécies.

25 Nessa análise, uma divisão posterior separa o par de espécies *P. roseo-alba* e *S.*  
26 *fasciculata*, que apresentam flores grandes e os maiores nectários, que também foi  
27 recuperado na análise com apenas os caracteres morfológicos, porém não na análise  
28 utilizando apenas os caracteres anatômicos. Essas espécies são polinizadas por insetos  
29 com aparelho bucal longo (borboletas e abelhas euglossinae, respectivamente). Porém as  
30 demais espécies polinizadas por *Lepidoptera* (*S. elatum* e *E. triloba*) aparecem dispersas  
31 no dendrograma, em ambas as análises utilizando apenas caracteres anatômicos e apenas  
32 caracteres morfológicos. Ambos os gêneros que tiveram mais de uma espécie estudada  
33 (*Cyclopogon* e *Prescottia*) apresentaram essas espécies congênicas agrupadas na

1 análise com apenas os caracteres morfológicos, mas não na análise com apenas os  
2 caracteres anatômicos.

3 O único grupo formado inteiramente por e incluindo todas as espécies  
4 apresentando uma mesma síndrome de polinização é o constituído pelas espécies  
5 ornitófilas (*D. cinnabarinus*, *S. lanceolata* e *S. balanophorostachya*). Porém, ao contrário  
6 do esperado, este grupo não é recuperado na análise com apenas os caracteres  
7 morfológicos. Mais inesperadamente ainda, este grupo aparece como o mais coeso e  
8 diferenciado na análise utilizando apenas os caracteres anatômicos.

9 Na análise utilizando a matriz com apenas os caracteres anatômicos, cinco grupos  
10 mais bem delimitados podem ser visualizados (Figura 11). O grupo formado a partir da  
11 primeira divisão (*C. chloroleucus*, *C. candida* e *P. oligantha*) é caracterizado  
12 principalmente pela ausência de tricomas na face adaxial do labelo na altura do estigma  
13 e da coluna. O grupo subsequente (*B. mexicana* e *S. fasciculata*) é caracterizado pela  
14 combinação de elevado número de camadas de células sub-epidérmicas no tecido secretor  
15 e presença de papila não glandular na face adaxial do terço médio do labelo. O terceiro  
16 grupo (*C. lutzii* e *C. elatus*) contém todas as espécies que possuem papilas glandulares e  
17 tricomas glandulares na epiderme da face adaxial do terço médio do labelo e células  
18 volumosas glandulares nas margens da face abaxial do terço médio do labelo. O grupo  
19 ornitófilo (*Dicromanthus*, *Sacoila* e *Skeptrostachys*), apesar de ser o mais coeso, e o que  
20 apresenta a maior similaridade entre as espécies, não possui caracteres que o distingua  
21 claramente, sendo este caracterizado por uma associação entre diversos caracteres, tais  
22 como número mínimo de 7 camadas de células sub-epidérmicas no tecido secretor e  
23 elevado número de feixes vasculares no nectário. O grupo restante (*Lankesterella*-  
24 *Sauroglossum*) é caracterizado por ser o único a possuir papilas na face secretora do  
25 nectário (exceto em *P. pterygantha*) e pelos valores mais elevados da espessura máxima  
26 do mesofilo no terço médio do labelo, expressa em número de células do parênquima.  
27 Estes dois últimos grupos juntos formam um grupo caracterizado pela presença em todas  
28 as espécies de papilas não glandulares na epiderme do terço apical do labelo (também  
29 observado em *Mesadenella*).

30 Nenhum dos grupos citados na análise utilizando apenas os caracteres anatômicos  
31 foi recuperado na análise empregando a matriz com apenas os caracteres morfológicos.  
32 Além dos dois grupos já mencionados que foram também observados na análise com

1 todos os caracteres (*Pteroglossa/Sarcoglottis* e *Cranichidinae*), todos os demais são  
2 principalmente formados com relação ao tamanho das flores.

3

#### 4 ***Otimização de caracteres estruturais***

5

6 Todos os caracteres anatômicos (binários, multiestado e merísticos) apresentaram  
7 algum grau de homoplasia, variando de dois a seis passos evolutivos nas árvores  
8 filogenéticas. De uma maneira geral, não foi observada correlação entre a evolução destes  
9 caracteres e a filogenia do grupo ou com as síndromes de polinização, com poucas  
10 exceções. Porém, a evolução de alguns caracteres é digna de nota, e são apresentados  
11 alguns exemplos dos padrões gerais observados.

12 Diversos caracteres surgiram em posições bastante distintas da árvore  
13 filogenética, tais como as papilas glandulares cônicas na face adaxial do terço médio do  
14 labelo, ocorrendo em posição basal (*Cotylolabium*) e em um dos gêneros mais derivados  
15 (*Cyclopogon*) na subtribo. A presença de papilas na face secretora do nectário surgiu  
16 independentemente três vezes, em diferentes grandes clados, e em espécies  
17 comprovadamente (*S. elatum* e *P. roseo-alba*) ou supostamente (*L. ceracifolia*)  
18 polinizadas por Lepidoptera (Figura 12A). Por outro lado, alguns caracteres também  
19 surgiram independentemente três vezes em três diferentes grandes clados e não  
20 associados com síndromes de polinização, tais como presença de papila não glandular na  
21 face adaxial do terço médio do labelo, presença de epiderme secretora, e presença de  
22 papilas glandulares esféricas na face adaxial do terço médio do labelo (Figura 12B). A  
23 ocorrência de tricomas unicelulares alongados na superfície adaxial do terço basal do  
24 labelo envolveu cinco passos evolutivos em diversos grandes clados (Figura 12C) e a  
25 presença de tricomas unicelulares alongados nas margens do terço basal do labelo  
26 envolveu seis passos evolutivos, sendo a sua perda uma sinapomorfia do clado 3 ("clado  
27 Pelexia") (Figura 12D).

28 A presença de células volumosas glandulares entre meio e borda da face abaxial  
29 do terço médio do labelo é uma característica simplesiomórfica na subtribo, perdida  
30 posteriormente quatro vezes no grupo. A perda destas células é uma sinapomorfia dos  
31 grandes clados 2 ("clado Stenorrynchos") e 5 ("clado *Spiranthes*"), onde está a maioria  
32 das espécies polinizadas por beija-flores e lepidóptera amostradas, além disto ocorrendo  
33 também em *S. fasciculata*, polinizada por abelhas de aparelho bucal longo (Euglossinae)



1 (Figura 13A). Em relação à forma da cavidade nectarífera, a presença de mento é  
2 provavelmente uma sinapomorfia da subtribo *Spiranthinae*, com alteração da forma para  
3 cálcio ou cavidade longamente decorrente com o ovário independentemente em dois  
4 cladogramas (Figura 13B). Não foi observada uma correlação clara entre o comprimento  
5 do nectário e as síndromes de polinização ou a evolução do grupo (Figura 13C), porém  
6 alguma tendência a cavidades nectaríferas maiores nas espécies polinizadas por aves,  
7 lepidópteros e abelhas de língua longa, espalhadas ao longo de todos os grandes cladogramas  
8 (Figura 13D).

9  
10

## 11 **DISCUSSÃO**

12

13 As características estruturais e ultraestruturais das aurículas, observadas na porção  
14 basal do labelo em todas as espécies de *Spiranthinae* e *Cranichidinae* (exceto *C. candida*),  
15 indicam que essas estruturas são nectários, corroborando a nossa primeira hipótese. Essas  
16 características, tais como presença de elevada densidade citoplasmática, núcleo  
17 volumoso, numerosos plastídios contendo grãos de amido, mitocôndrias e retículo  
18 endoplasmático bem desenvolvido, são associadas a alta atividade metabólica e  
19 relacionadas à produção de secreção (Paiva, 2009). Apesar de não possuir aurículas, as  
20 células secretoras da face adaxial do labelo de *C. candida*, em sua porção basal,  
21 apresentam as mesmas características das células das aurículas, constituindo um nectário.  
22 Porém, a nossa segunda hipótese, sobre a correlação da estrutura do nectário em flores de  
23 *Spiranthinae* ser variável e correlacionada à síndrome de polinização, não foi corroborada  
24 pelos resultados, nem mesmo em relação ao tamanho do nectário ou número de feixes  
25 associados a ele, esperado serem maiores nas espécies que produzem maior volume de  
26 néctar.

27 A ausência de estômatos nos nectários de todas as espécies e o acúmulo de  
28 secreção no espaço subcuticular (veja Figura 10) sugerem que a secreção é liberada  
29 através de rupturas na cutícula (Paiva, 2017). A atividade secretora nas aurículas na  
30 subtribo *Spiranthinae* foi previamente observada em *Cyclopogon dutrae*, *Pelexia*  
31 *bonariensis*, *Sacoila lanceolata* (Galletto *et al.*, 1997), *Cotylolabium lutzii* (Borba *et al.*,  
32 2014) e *Pteroglossa roseo-alba* (Pansarin & Ferreira, 2015), as quais foram objeto de  
33 estudos anatômicos. As mesmas características estruturais também foram observadas nos

1 nectários das orquídeas *Hexisea imbricata* (Stpiczynska *et al.*, 2005), *Maxilaria coccinea*  
2 (Stpiczynska *et al.*, 2003) e algumas espécies de *Bulbophyllum* (Teixeira *et al.*, 2004). A  
3 presença de gotas de néctar no labelo de algumas espécies, na região das aurículas, reforça  
4 essa conclusão. Diversos outros autores mencionam a presença de secreção, que eles  
5 denominam néctar, abaixo da coluna e na cavidade nectarífera, porém esses estudos não  
6 procuram definir o local de produção do néctar.

7         As células globosas encontradas no labelo de *C. lutzii*, *C. elatus*, *L. ceracifolia*, *P.*  
8 *pterygantha*, *S. elatum*, *C. candida* e *P. oligantha* apresentam características típicas de  
9 células secretoras similares às descritas para os osmóforos em outros membros da família  
10 Orchidaceae (Dressler, 1981; Pridgeon & Stern, 1983; Stern *et al.*, 1987; Singer &  
11 Cocucci, 1999; Stpiczynska, 2001; Teixeira *et al.*, 2004; Wiemer *et al.*, 2009; Melo *et al.*,  
12 2010; Johnson *et al.*, 2013; Borba *et al.*, 2014; Sanguinetti & Singer, 2014). Células  
13 secretoras contendo uma grande quantidade de mitocôndrias, retículo endoplasmático e  
14 plastídios, além de dictiosomos ausentes ou pouco desenvolvidos, apresentam  
15 maquinaria celular compatível com a síntese de terpenóides (Evert, 2006), metabólitos  
16 secundários voláteis comumente presentes na fragrância das flores (Buchanam *et al.*,  
17 2000). Essas características citoplasmáticas foram observadas em células epidérmicas no  
18 labelo de *C. elatus* e *S. elatum*, o que somado às características anatômicas e à detecção  
19 de odores por meio de análise sensorial, nos permite afirmar acerca da presença de  
20 osmóforos nestas espécies, bem como inferir a presença destas estruturas nas demais  
21 espécies de Spiranthinae e Cranichidinae aqui estudadas. É importante notar que as  
22 regiões definidas como osmóforos neste trabalho, majoritariamente possuem células com  
23 estrutura semelhante. Entretanto, deve-se considerar a possibilidade da presença de  
24 osmóforos nas demais espécies melitófilas que aqui foram caracterizadas como não  
25 apresentando células globosas na face abaxial, típicas dos osmóforos neste grupo.

26         Comuns em flores de Orchidaceae, os osmóforos podem ser encontrados no  
27 labelo, pétalas ou sépalas, em geral dispostos na face adaxial (Dressler, 1981; Pridgeon  
28 & Stern, 1983; Stern *et al.*, 1987; Singer & Cocucci, 1999; Stpiczynska, 2001; Teixeira  
29 *et al.*, 2004; Wiemer *et al.*, 2008; Melo *et al.*, 2010; Johnson *et al.*, 2013; Borba *et al.*,  
30 2014; Sanguinetti & Singer, 2014). Porém, nas espécies de Spiranthinae e de  
31 Cranichidinae aqui estudadas, os osmóforos estão localizados na face abaxial do labelo,  
32 uma posição incomum e descrita previamente apenas em *C. elatus* (Wiemer *et al.*, 2008)  
33 e *C. lutzii* (Borba *et al.*, 2014). Provavelmente, a presença de osmóforos na face abaxial

1 está associada à atração de abelhas à curta distância (aproximação à flor), enquanto a  
2 sinalização do local exato para a introdução da cabeça e do aparato bucal é feita por guias  
3 visuais de néctar (regiões com pigmentos que absorvem no ultravioleta), comuns em  
4 orquídeas (van der Pijl & Dodson, 1966; Dressler, 1981; Proctor *et al.*, 1996). A presença  
5 de osmóforos na face abaxial do labelo, principalmente das espécies melitófilas, sugere  
6 que esta é uma característica conservada na tribo, mas perdida em alguns momentos da  
7 evolução do grupo, como evidenciado na análise de otimização de caracteres, reforçando  
8 a nossa terceira hipótese. A perda destes osmóforos na face abaxial do labelo no grande  
9 clado 2 (“clado Stenorrhynchos”), pode ter possibilitado a irradiação para outros grupos  
10 de polinizadores, tais como beija-flores (que não necessitam do odor na atração de flores)  
11 e Lepidoptera. Neste último grupo, principalmente nas mariposas, o odor liberado pelos  
12 osmóforos atuam como atrativo à longa distância e também como indicativo do local  
13 exato onde estes insetos precisam enfiar a probóscide para obter o recurso (Proctor *et al.*,  
14 1996). Desta maneira, é provável que, nestas espécies, o osmóforo esteja localizado na  
15 superfície adaxial do labelo, o mesmo podendo ser esperado para a espécie polinizada por  
16 abelhas de aparelho bucal tão longo quanto o de Lepidoptera (*S. fasciculata*).

17 A ausência de osmóforos nas espécies ornitófilas (*D. cinnabarinus*, *S. lanceolata*  
18 e *S. balanophorostachya*) era esperada, pois flores polinizadas por aves não costumam  
19 apresentar odor (van der Pil & Dodson, 1966; Dressler, 1981). Além disso, características  
20 como flores tubulares, cavidade nectarífera estreita e perianto avermelhado, também  
21 sugerem uma síndrome de polinização ornitófila (van der Pil & Dodson, 1966; Dressler,  
22 1981; Galetto *et al.*, 1997; Singer & Sazima, 2000). Porém, o agrupamento das espécies  
23 ornitófilas estudadas a partir de caracteres anatômicos era inesperado, visto que não há  
24 nenhum caráter exclusivo para esse grupo na matriz de dados. Estas espécies  
25 compartilham uma associação de diversos caracteres que as recupera como um grupo nas  
26 análises morfométricas. Mais inesperado ainda, as espécies ornitófilas não formam um  
27 grupo coeso na análise de dados morfológicos, possivelmente porque cor e odor não  
28 foram características utilizadas na matriz de dados, e são chave para identificação de  
29 espécies ornitófilas. Salazar e colaboradores (2011) sugerem que a síndrome de  
30 polinização por beija-flores surgiu várias vezes na subtribo Spiranthinae, e tiveram  
31 evolução convergente e por isso apresentam morfologia semelhante, não representando  
32 assim um único clado.

1           A separação das duas espécies de *Prescottia* e de *C. candida* (Cranichidinae) do  
2 grupo das Spiranthinae era esperada, bem como uma similaridade anatômica maior entre  
3 essas três espécies. Porém, Cranichidinae foi recuperada apenas nas análises  
4 morfológicas, em grande parte devido ao compartilhamento do não ressupinamento da  
5 flor e das flores muito reduzidas, sendo que nas análises anatômicas *P. oligantha* se  
6 separou das outras duas espécies e ficou imersa nas Spiranthinae. *C. candida* possui  
7 características singulares dentre todas as espécies estudadas, como a ausência de nectários  
8 em aurículas, as margens da porção basal do labelo aderentes aos lados da coluna e  
9 epiderme secretora e, portanto, seria mais provável de se separar das *Prescottia*. Porém,  
10 a sua distinção não é tão acentuada quanto a de *P. oligantha* em relação às demais  
11 Cranichidinae. Esta é causada pelo compartilhamento de caracteres anatômicos  
12 homoplásicos com algumas espécies de Spiranthinae, tais como a presença de tricomas  
13 nos terços basal e médio do labelo, não encontrados nas outras duas espécies de  
14 Cranichidinae e compartilhado com *E. triloba*, *M. cuspidata* (ambas clado 2) e *C. elatus*  
15 (clado 3).

16           A nossa quarta hipótese, de que a estrutura dos osmóforos em flores de  
17 Spiranthinae possui sinal filogenético, não estando correlacionada às síndromes de  
18 polinização, mas sim às linhagens, pode ser descartada. Tendo sido observado o mesmo  
19 para os demais caracteres estruturais em geral, podemos indicar que tais estruturas  
20 anatômicas presentes no labelo das espécies de Spiranthinae (e provavelmente também  
21 nas Cranichidinae) podem ser enganosas na realização de inferências filogenéticas, e que,  
22 em grande parte, isto se deve à forte pressão ecológica pelos quais estas estruturas passam.

## 1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

2  
3 **Azevedo CO, van den Berg C, Barros F. 2014.** A revision of *Prescottia* (Orchidaceae:  
4 Orchidoideae, Cranichideae). *Phytotaxa* **178**: 233-286.

5 **Borba EL, Salazar GA, Mazzoni-Viveiros S, Batista JAN. 2014.** Phylogenetic position  
6 and floral morphology of the brazilian endemic, monospecific genus *Cotylolabium*:  
7 a sister group for the remaining Spiranthinae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the*  
8 *Linnean Society* **175**: 29–46.

9 **Brundrett MC, Kendrick B, Peterson CA. 1991.** Efficient lipid staining in plant  
10 material with Sudan Red 7B or fluorol yellow 088 in polyethylene glycol-glycerol.  
11 *Biotechnic and Histochemistry* **66**: 111-116.

12 **Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL. 2015.** *Biochemistry and Molecular Biology of*  
13 *Plants*. Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists.

14 **Catling PM. 1987.** Notes on the breeding systems of *Sacoila lanceolata* (Aublet) Garay  
15 (Orchidaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*. **74**: 58-68.

16 **Dafni A. & Ivri Y. 1979.** Pollination ecology of, and hybridization between, *Orchis*  
17 *coriophora* L. and *O. collina* Sol. ex. Russ. (Orchidaceae) in Israel. *New Phytologist*  
18 **83**: 181–187.

19 **Dressler RL. 1981.** *The orchids: natural history and classification*. Cambridge: Harvard  
20 University Press.

21 **Evert RF. 2006.** *Esau's Plant Anatomy: Meristems, Cells and Tissues of the Plant Body:*  
22 *Their Structure, Function, and Development*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons.

23 **Fahn A. 1979.** *Secretory tissues in plants*. Londres: Academic Press.

24 **Galetto L, Bernadello G, Rivera GL. 1997.** Nectar, nectaries, floral visitors, and  
25 breeding systems of five terrestrial Orchidaceae from central Argentina. *Journal of*  
26 *Plant Research* **110**: 393-403.

27 **Gower JC. 1971.** A general coefficient of similarity and some of its properties.  
28 *Biometrics* **27**: 857-872.

29 **Hoehne FC. 1945.** Orchidaceae. In: Hoehne FC. ed. *Flora Brasílica*. São Paulo:  
30 Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio de São Paulo, v. 12, p. 2, 1-389.

31 **Jensen WA. 1962.** *Botanical histochemistry: principles and practice*. San Francisco:  
32 Freeman.

33 **Johansen DA. 1940.** *Plant microtechnique*. New York, NY: McGraw Book Co.

- 1 **Karnovsky MJ. 1965.** A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of light osmolality for  
2 use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* **27**: 137A–138A.
- 3 **Maddison WP, Maddison DR. 2017.** *Mesquite: a modular system for evolutionary*  
4 *analysis, version 3.11.* Available at: <http://mesquiteproject.org>.
- 5 **Melo MC, Borba, EL, Paiva EAS. 2010.** Morphological and histological  
6 characterization of the osmophores and nectaries of four species of *Acianthera*  
7 (Orchidaceae: Pleurothallidinae). *Plant Systematics and Evolution* **286**: 141-151.
- 8 **O'Brien TP, Feder N, McCully ME. 1964.** Polychromatic staining of plant cell walls by  
9 toluidine blue O. *Protoplasma* **59**: 368–373.
- 10 **Paiva EAS. 2009.** Ultrastructure and post-floral secretion of the pericarpial nectaries of  
11 *Erythrina speciosa* (Fabaceae). *Annals of Botany* **104**: 937–944.
- 12 **Paiva EAS. 2017.** How does the nectar of stomata-free nectaries cross the cuticle? *Acta*  
13 *Botanica Brasilica* **31**: 525-530.
- 14 **Pansarin ER & Ferreira AWC. 2015.** Butterfly pollination in *Pteroglossa*  
15 (Orchidaceae, Orchidoideae): a comparative study on the reproductive biology of two  
16 species of a neotropical genus of Spiranthinae. *Journal of Plant Research* **128**: 459–  
17 468.
- 18 **Pridgeon AM, Stern WL. 1983.** Ultrastructure of osmophores in *Restrepia*  
19 (Orchidaceae). *American Journal of Botany* **70**: 1233-1243.
- 20 **Proctor M, Yeo P, Lack A. 1996.** *The natural history of pollination.* London: Harper  
21 Collins Publishers.
- 22 **Reynolds ES. 1963.** The use of the lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in  
23 electron microscopy. *Journal of Cell Biology* **17**: 208–212.
- 24 **Robards AW. 1978.** An introduction to techniques for scanning electron microscopy of  
25 plant cells. In: Hall JL. ed. *Electron microscopy and cytochemistry of plant cells.* New  
26 York: Elsevier, 343–403.
- 27 **Roland JC. 1978.** General preparations and staining of thin sections. In: Hall JL. ed.  
28 *Electron microscopy and cytochemistry of plant cells.* New York: Elsevier, 1–62.
- 29 **Salazar GA. 2003.** Spiranthinae. In: Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen  
30 FN, eds. *Genera Orchidacearum, Vol. 3: Orchidoideae, Part 2, Vanilloideae.*  
31 Oxford: Oxford University Press, 164-278.

- 1 **Salazar GA. 2009.** Orquídeas. In: Lot A, Cano Z, eds. *Biodiversidad del Ecosistema*  
2 *Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel*. Mexico City: Universidad Nacional  
3 Autónoma de México, 153-169.
- 4 **Salazar GA, Ballesteros-Barrera C 2010.** *Sotoa*, a new genus of Spiranthinae  
5 (Orchidaceae) from Mexico and the southern United States. *Lankesteriana* **9**: 491-  
6 504.
- 7 **Salazar GA, Chase MW, Soto Arenas MA, Ingrouille M. 2003.** Phylogenetics of  
8 Cranichideae with emphasis on Spiranthinae (Orchidaceae, Orchidoideae): evidence  
9 from plastid and nuclear DNA sequences. *American Journal of Botany* **90**: 777–795.
- 10 **Salazar GA, Cabrera LI, Figueroa C. 2011.** Molecular phylogenetics, floral  
11 convergence and systematics of *Dichromanthus* and *Stenorrhynchos* (Orchidaceae,  
12 Spiranthinae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **167**: 1–18.
- 13 **Salazar GA, Batista JAN, Cabrera LI, van den Berg C, Whitten WM, Smidt EC,**  
14 **Buzatto CR, Singer RB, Gerlach G, Jiménez-Machorro R, Radins JA,**  
15 **Insaurralde I, Guimarães LRS, Barros F, Tobar F, Linares JL, Mújica E,**  
16 **Dressler RL, Blanco MA, Hágsater E, Chase MW. 2018.** Phylogenetic systematics  
17 of subtribe Spiranthinae (Orchidaceae: Orchidoideae: Cranichideae) based on nuclear  
18 and plastid DNA sequences of a nearly complete generic sample. *Botanical Journal*  
19 *of the Linnean Society* (no prelo).
- 20 **Sanguinetti A, Singer RB. 2014.** Invasive bees promote high reproductive success in  
21 andean orchids. *Biological Conservation* **175**: 10–20.
- 22 **Shepherd GJ. 2010.** FITOPAC Versão 2.1. Campinas, SP: Departamento de Botânica,  
23 Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.
- 24 **Singer RB. 2002.** The pollination biology of *Sauroglossum elatum* Lindl. (Orchidaceae:  
25 Spiranthinae): moth-pollination and protandry in neotropical Spiranthinae. *Botanical*  
26 *Journal of the Linnean Society* **13**: 9–16.
- 27 **Singer RB, Cocucci AA. 1999.** Pollination mechanisms in southern brazilian orchids  
28 which are mainly or exclusively pollinated by halictid bees. *Plant Systematics and*  
29 *Evolution* **217**: 101–117.
- 30 **Singer RB, Sazima M. 1999.** The pollination mechanism in the ‘*Pelexia* alliance’  
31 (Orchidaceae: Spiranthinae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **131**: 249–262.

- 1 **Singer RB, Sazima M. 2000.** The pollination of *Stenorrhynchos lanceolatus* (Aublet)  
2 LC Rich. (Orchidaceae: Spiranthinae) by hummingbirds in southeastern Brazil. *Plant*  
3 *Systematics and Evolution* **223**: 221–227.
- 4 **Singer RB, Sazima M. 2001.** The pollination mechanism of three sympatric *Prescottia*  
5 (Orchidaceae: Prescottinae) species in Southeastern Brazil. *Annals of Botany* **88**:  
6 999-1005.
- 7 **Stern WL, Curry KJ, Pridgeon AM. 1987.** Osmophores of *Stanhopea* (Orchidaceae).  
8 *American Journal of Botany* **74**: 1323-1331.
- 9 **Stpiczynska M. 2001.** Osmophores of the fragrant orchid *Gymnadenia conopsea* L.  
10 (Orchidaceae). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* **70**: 91-96.
- 11 **Stpiczynska M, Davies KL, Gregg A. 2003.** Nectary structure and nectar secretion in  
12 *Maxillaria coccinea* (Jacq.) L.O. Williams ex Hodge (Orchidaceae). *Annals of*  
13 *Botany* **93**: 87-95.
- 14 **Stpiczynska M, Davies KL, Gregg A. 2005.** Comparative account of nectary structure  
15 in *Hexisea imbricata* (Lindl.) Rchb.f. (Orchidaceae). *Annals of Botany* **95**: 749-756.
- 16 **Stpiczynska M, Davies KL, Gregg A. 2005.** Nectar-secreting floral stomata in  
17 *Maxillaria anceps* Ames & C. Schweinf. (Orchidaceae). *Annals of Botany* **96**: 217–  
18 227.
- 19 **Swofford DL. 2017.** *PAUP\**. *Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other*  
20 *methods)*, version 4. Sunderland: Sinauer Associates.
- 21 **Teixeira SP, Borba EL, Semir J. 2004.** Lip anatomy of Brazilian Bulbophyllum species  
22 (Orchidaceae). *Annals of Botany* **93**: 499-505.
- 23 **van der Pijl L, Dodson CH. 1966.** *Orchid flowers: their pollination and evolution*. Coral  
24 Gables, FL: University of Miami Press.
- 25 **Vogel S. 1990.** *The role of scent glands in pollination: on the structure and function of*  
26 *osmophores*. English translation. Ed. by Renner, S. Washington: Smithsonian  
27 Institution Libraries, New Delhi: Amerind Publ. Comp. Ltd.
- 28 **Watson, M. L. 1958.** Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy  
29 metals. *Journal of Biophysics and Biochemistry Cytology* **4**: 475-478.
- 30 **Wiemer AP, Moré M, Benitez-Vieyra S, Cocucci AA, Raguso RA, Sérsic AN. 2009.**  
31 A simple floral fragrance and unusual osmophore structure in *Cyclopogon elatus*  
32 (Orchidaceae). *Plant Biology* **11**: 506–514.



**Tabela 1.** Espécies de Spiranthinae e Cranichidinae (Orchidaceae, Cranichidae) incluídas no estudo anatômico e morfológico do labelo. Clado principal na filogenia mais recente de Spiranthinae (veja Figura 1). Vouchers depositados nos Herbário do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (BHCB), exceto quando indicado (MEXU - Herbario Nacional de México, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México).

Espécies	Clado	Localidade	Voucher	Análise	Síndrome de Polinização
Spiranthinae					
<i>Beloglottis mexicana</i>	5	México	Salazar <i>et al.</i> 9349 (MEXU)	ML	Melitofilia
<i>Cotylolabium lutzii</i>	1	Alto Caparaó-MG	Costa 326 (BHCB)	MEV e MET	Melitofilia <sup>1</sup>
<i>Cyclopogon chloroleucus</i>	3	Alto Caparaó-MG	Batista <i>et al.</i> 3398 (BHCB)	ML	Melitofilia
<i>Cyclopogon elatus</i>	3	Santa Rita de Caldas-MG		ML, MEV, MET	Melitofilia <sup>2</sup>
<i>Dichromanthus cinnabarinus</i>	5	México	Figueroa 196 (MEXU)	ML	Ornitofilia <sup>3</sup>
<i>Eltroplectris triloba</i>	2	Rio de Janeiro-RJ	Batista <i>et al.</i> 3160 (BHCB)	ML	Falenofilia
<i>Lankesterella ceracifolia</i>	4	Benedito Novo-SC		ML e MEV	Melitofilia/Falenofilia?
<i>Mesadenella cuspidata</i>	2	Belo Horizonte-MG	Batista & Ferreira 3394 (BHCB)	ML, MEV, MET	Melitofilia
<i>Pelexia pterygantha</i>	3	Moeda-MG	Batista <i>et al.</i> 3368 (BHCB)	ML, MEV, MET	Melitofilia
<i>Pteroglossa roseo-alba</i>	2	Itirapina-SP	Pansarin, LBMBP 801	ML	Psicofilia <sup>4</sup>
<i>Sacoila lanceolata</i>	2	Caeté-MG	Batista <i>et al.</i> 3431 (BHCB)	ML, MEV, MET	Ornitofilia <sup>5</sup>
<i>Sarcoglottis fasciculata</i>	3	MHNJB da UFMG - MG	Batista 3342 (BHCB)	ML	Melitofilia
<i>Sauroglossum elatum</i>	3	Santa Bárbara-MG	Paiva s.n (BHCB)	ML, MEV, MET	Falenofilia <sup>6</sup>
<i>Skeptrostachys balanophorostachya</i>	2	Moeda-MG	Batista <i>et al.</i> 3389 (BHCB)	ML	Ornitofilia
Cranichidinae					
<i>Cranichis candida</i>		Alto Caparaó-MG	Batista <i>et al.</i> 3395 (BHCB)	ML, MEV, MET	Melitofilia
<i>Prescottia glazioviana</i>		Alto Caparaó-MG	Batista <i>et al.</i> 3381 (BHCB)	ML	Melitofilia/Miiofilia (?)
<i>Prescottia oligantha</i>		Santana do Riacho-MG		ML	Melitofilia/Miiofilia (?)

Dados retirados de: **1.** Borba *et. al* (2014). **2.** Wiemer *et. al* (2009). **3.** Salazar *et. al* (2011). **4.** Pansarin & Ferreira (2015). **5.** Singer & Sazima (2000). **6.** Singer (2002).

**Tabela 2.** Caracteres anatômicos e morfológicos estudados em 14 espécies de Spiranthinae e três de Cranichidinae (Orchidaceae, Cranichidae). Para dados de Presença/Ausência, considerar: **0.** Ausente, **1.** Presente. \*Dados retirados de Borba *et al.* (2014). Veja Tabela 1 para nomes das espécies.

Caracteres	Spiranthinae														Cranichidinae		
	<i>Cot_lu*</i>	<i>Bel_me</i>	<i>Cyc_ch</i>	<i>Cyc_el</i>	<i>Dic_ci</i>	<i>Elt_tr</i>	<i>Lan_ce</i>	<i>Mes_cu</i>	<i>Pel_pt</i>	<i>Pte_ro</i>	<i>Sac_la</i>	<i>Sar_fa</i>	<i>Sau_el</i>	<i>Ske_ba</i>	<i>Cra_ca</i>	<i>Pre_gl</i>	<i>Pre_ol</i>
Papilas face secretora nectário	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
Nº mín. camadas células sub-epidérmicas tecido secr. (1= < 15, 2= >15)	1	15	20	4	8	9	1	7	6	5	7	20	1	7	4	3	6
Nº máx. camadas céls. sub-epidérmicas tec. secretor	4	30	30	11	13	11	8	9	7	6	15	40	4	9	7	5	10
Vascularização nect. (nº mín. feixes)	1	1	1	1	4	1	1	1	4	1	4	4	1	3	6	1	1
Vascularização nect. (nº máx. feixes)	4	2	2	2	4	2	2	1	5	2	10	4	1	3	6	2	1
Tricomas unicelulares alongados terço basal labelo (superfície adaxial)	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
Tricomas unicel. alongados terço basal labelo (superfície abaxial)	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
Tricomas unicel. alongados terço basal labelo (margens)	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1
Tricomas face adaxial labelo altura estigma e coluna	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1
Tricoma não glandular face adaxial terço médio labelo	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
Papila não gl. face adaxial terço médio labelo	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
Céls. secretoras face adaxial terço médio labelo	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Epiderme secretora	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Papila gl. epiderme face adaxial terço médio labelo	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

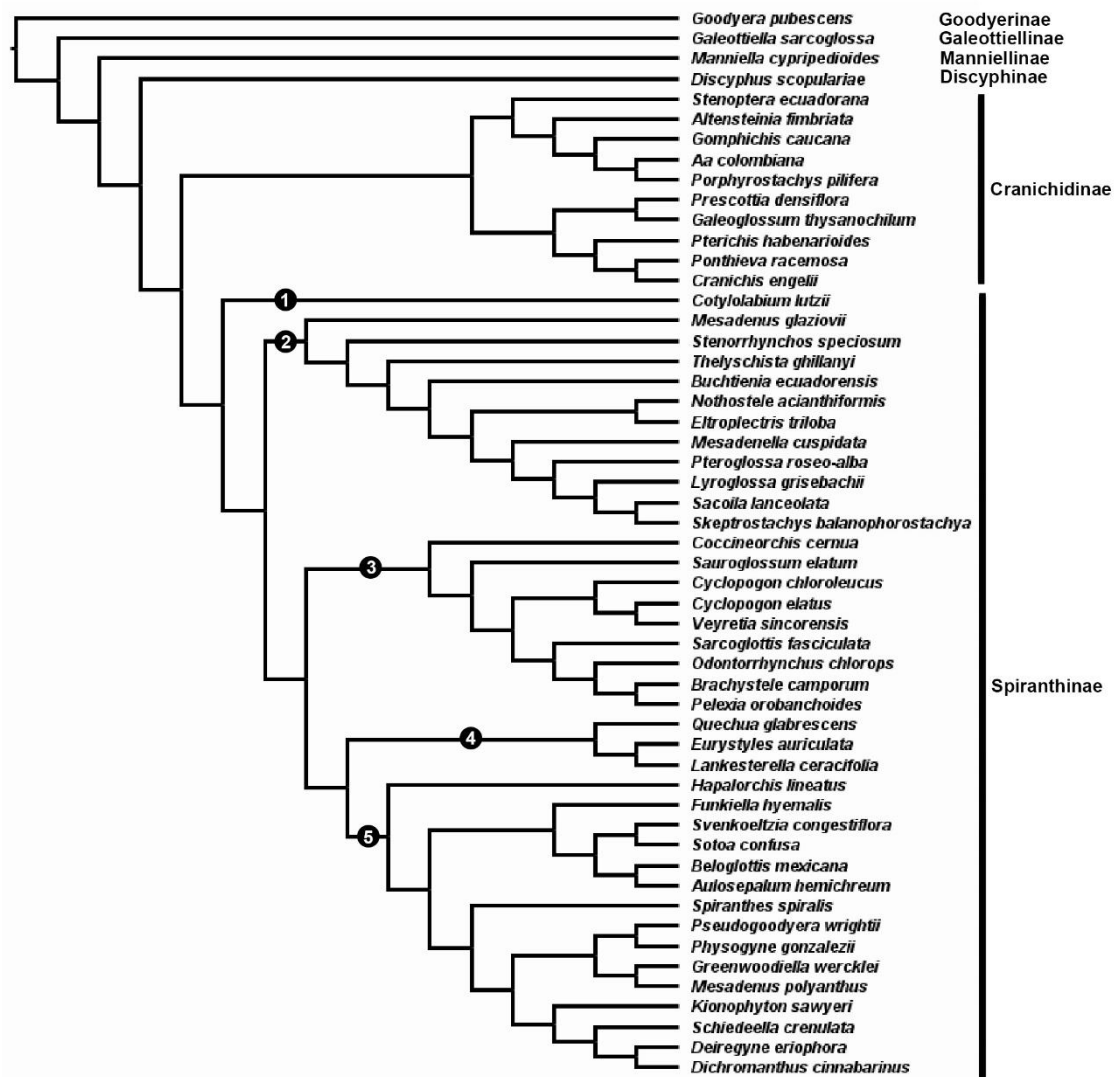
**Tabela 2.** Continuação...

Papilas gl. esféricas face adaxial terço médio labelo	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Papilas gl. cônicas face adaxial terço médio labelo	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tricomas glandulares na face adaxial do terço médio labelo	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Céls. volumosas gls. entre meio e bordo face abaxial terço médio labelo	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1
Céls. volumosas gls. margens face abaxial terço médio labelo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Papilas não gls. epiderme terço apical labelo	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0
Papila gl. epiderme face adaxial ápice labelo	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Espessura mín. mesofilo terço médio labelo (nº céls. parênquima)	7	3	6	6	4	5	6	4	7	6	5	7	7	4	4	7	3
Espessura máx. mesofilo terço médio labelo (nº céls. parênquima)	10	5	10	11	6	6	8	9	12	10	6	12	14	5	6	8	4
Espessura mín. mesofilo margens terço apical labelo (nº céls. parênquima)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1
Espessura máx. mesofilo margens terço apical labelo (nº céls. parênquima)	1	3	2	2	3	2	2	1	2	3	2	2	2	2	2	3	2
Espessura mín. mesofilo centro terço apical labelo (nº céls. parênquima)	1	3	4	3	3	3	3	2	5	5	2	3	4	4	5	4	2
Espessura máx. mesofilo centro terço apical labelo (nº céls. parênquima)	4	4	6	5	5	4	5	3	8	7	4	5	6	8	8	6	3
Comprimento flor (perianto + ovário) em mm	33	4,6	11,1	11,3	21,3	21,5	10,5	8,2	20,3	38,7	26,9	38,1	14,0	13,0	5,1	6,9	3,5
Compr. sépala dorsal	16,0	3,1	4,2	5,8	9,2	10,5	7,0	5,0	13,2	19,7	17,3	15,1	7,3	10,0	2,2	4,0	1,6

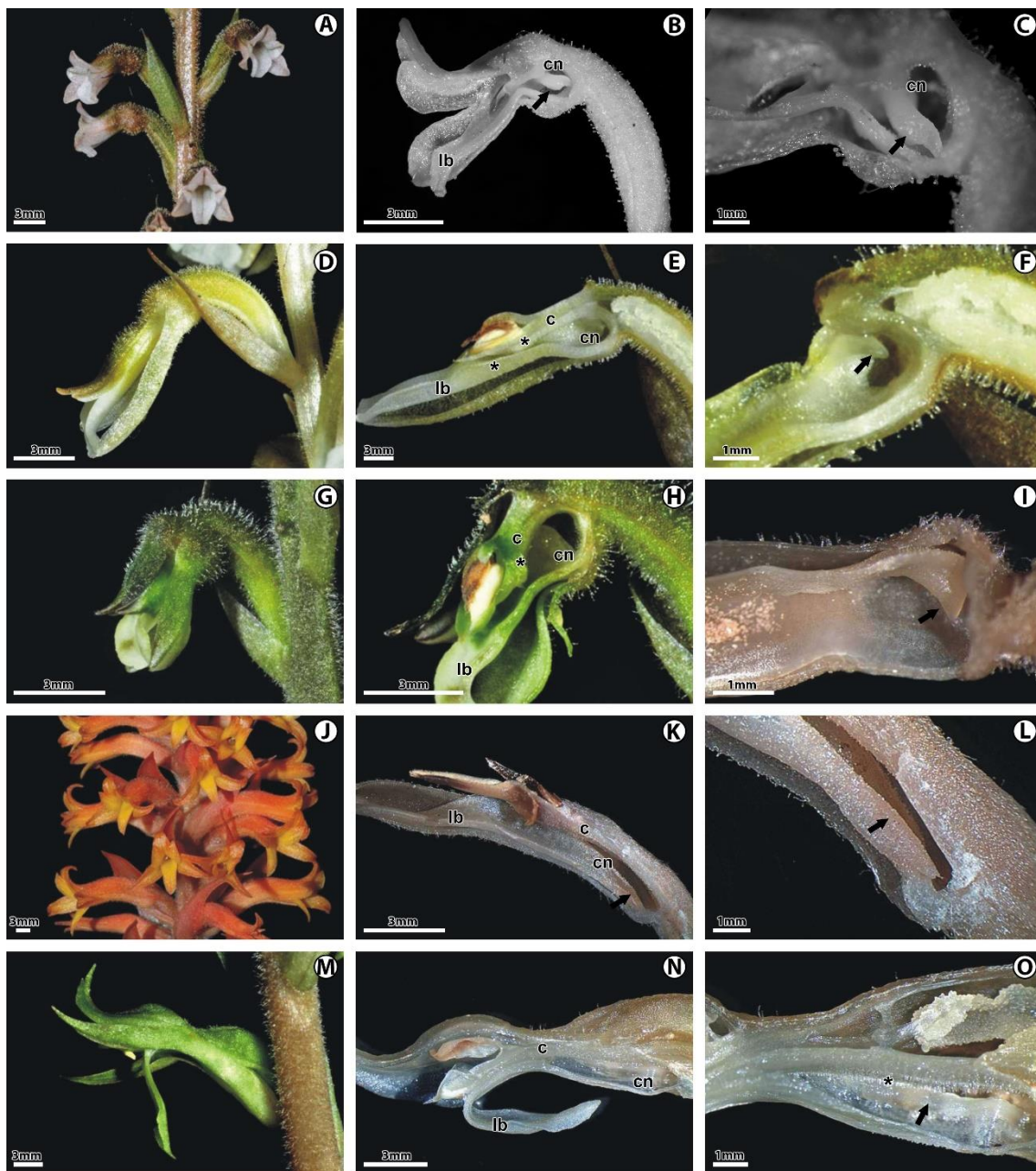
**Tabela 2.** Continuação...

Largura sépala dorsal	5,0	3	2,1	2,1	2,4	3,8	2,6	1,5	6,7	5,0	5,2	4,5	2,8	3,4	1,0	1,5	0,9
Compr. sépalas laterais	19,0	4,2	4,3	5,5	11,0	13,3	6,0	4,8	11,5	18,7	15,1	17,3	8,5	8,2	2,5	4,3	1,8
Larg. sépalas laterais	6,0	2,0	1,8	1,3	2,2	1,5	2,0	1,9	2,2	6,8	4,0	5,0	2,3	2,8	1,1	1,9	1,0
Comprimento pétalas	15,0	4,1	3,7	5,3	11,1	9,6	5,7	4,3	11,7	16,3	13,3	16,9	7,2	10,2	2,5	3,2	1,2
Larg. pétalas	4,0	1,6	1,3	1,1	2,0	3,4	1,7	1,5	3,4	4,7	5,1	3,1	1,5	3,6	0,5	1,3	0,6
Compr. labelo	15,0	3,2	5,0	8,1	16,1	14,3	9,7	5,0	15,3	23,1	16,6	22,6	8,3	9,5	2,4	3,7	2,2
Larg. labelo	8,5	2,2	3,3	2,0	2,4	2,4	2,8	1,5	4,9	4,6	3,2	5,2	3,3	2,5	1,5	3,2	2,0
Compr. nectário	4,0	1,2	1,0	1,0	2,0	3,2	2,3	1,2	3,0	9,6	3,6	5,4	1,2	1,9	0,0	1,0	0,4
Larg. nectário	3,8	0,5	1,0	0,6	0,5	1,2	0,7	1,2	1,3	0,8	0,8	1,2	1,0	0,7	0,0	1,0	0,3
Compr. cav. nectarífera	4,0	1,7	1,7	1,9	2,9	8,4	4,4	1,7	3,5	17,9	6,6	7,0	1,7	3,7	0,0	1,1	0,7
Larg. cav. nectarífera	3,8	1,7	1,6	2,0	1,4	1,7	1,3	0,9	4,1	2,6	3,3	3,0	1,3	1,7	0,0	1,6	0,5
Forma cav. nectarífera <sup>§</sup>	1	1	1	1	3	2	2	1	1	2	1	3	1	1	4	3	3
Margens porção basal labelo aderentes aos lados coluna	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
Presença de trabécula	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Labelo "plataforma"	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0
Flor Ressupinada	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
Odor <sup>#</sup>	Sim	NP	NP	NP	Não	NP	NP	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim

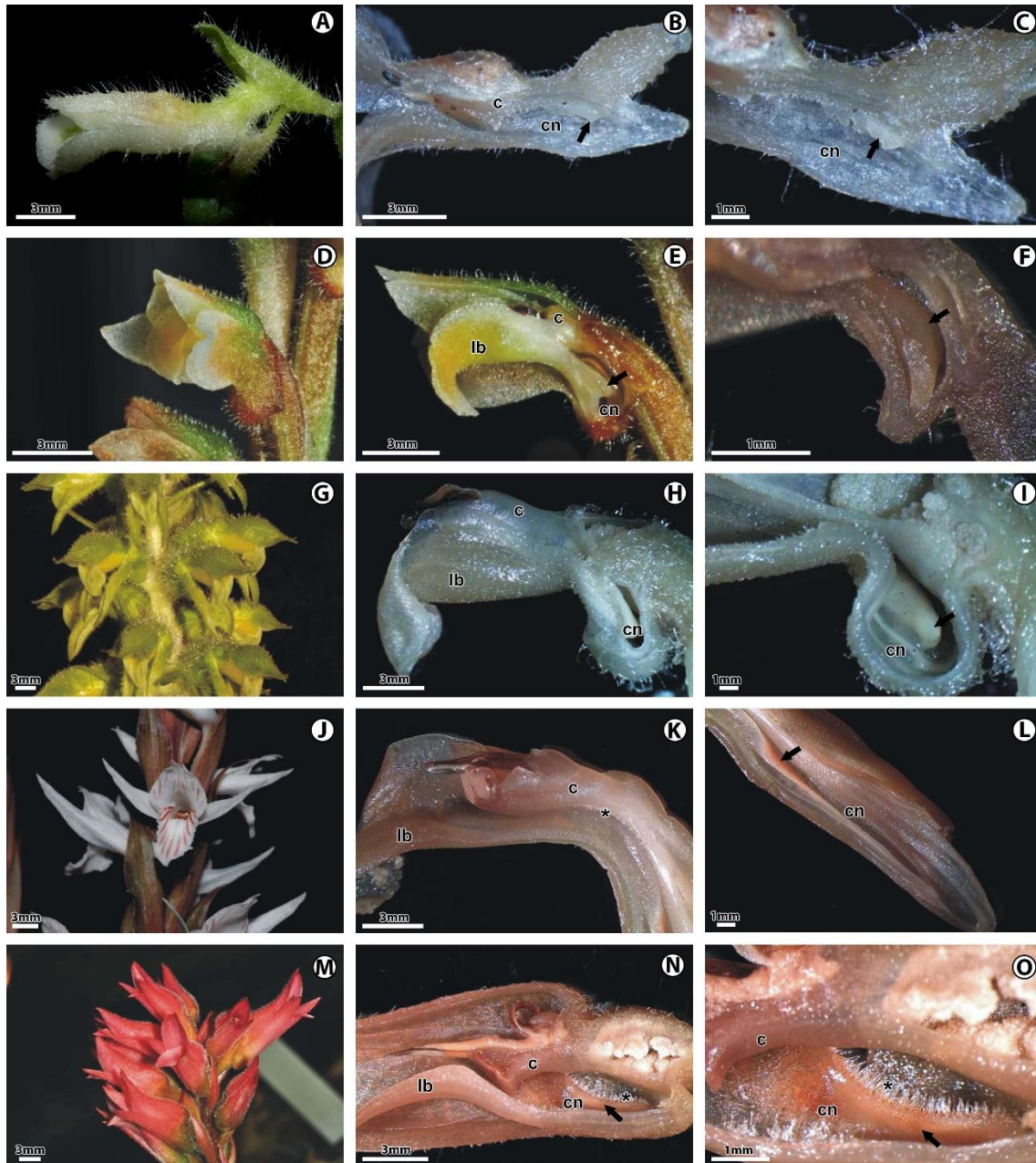
# - Caráter não utilizado nas análises; § = 1 - mento, 2 - cálcio, 3 - decorrente, 4 - ausente; NP= Não perceptível.



**Figura 1.** Relações filogenéticas na tribo Cranichideae (Orchidaceae), com ênfase na subtribo Spiranthinae, inferidas a partir de uma análise de parcimônia de sequências de DNA das regiões de cloroplasto *matK-trnK* e *trnL-trnF* e da região ribossômica nuclear ITS. Os números indicam as cinco principais linhagens da subtribo Spiranthinae: 1, *Cotylobium lutzii*; 2, clado *Stenorrhynchos*; 3, clado *Pelexia*; 4, clado *Eurystyles*; e 5, clado *Spiranthes*. Modificado de Salazar *et al.* (no prelo).

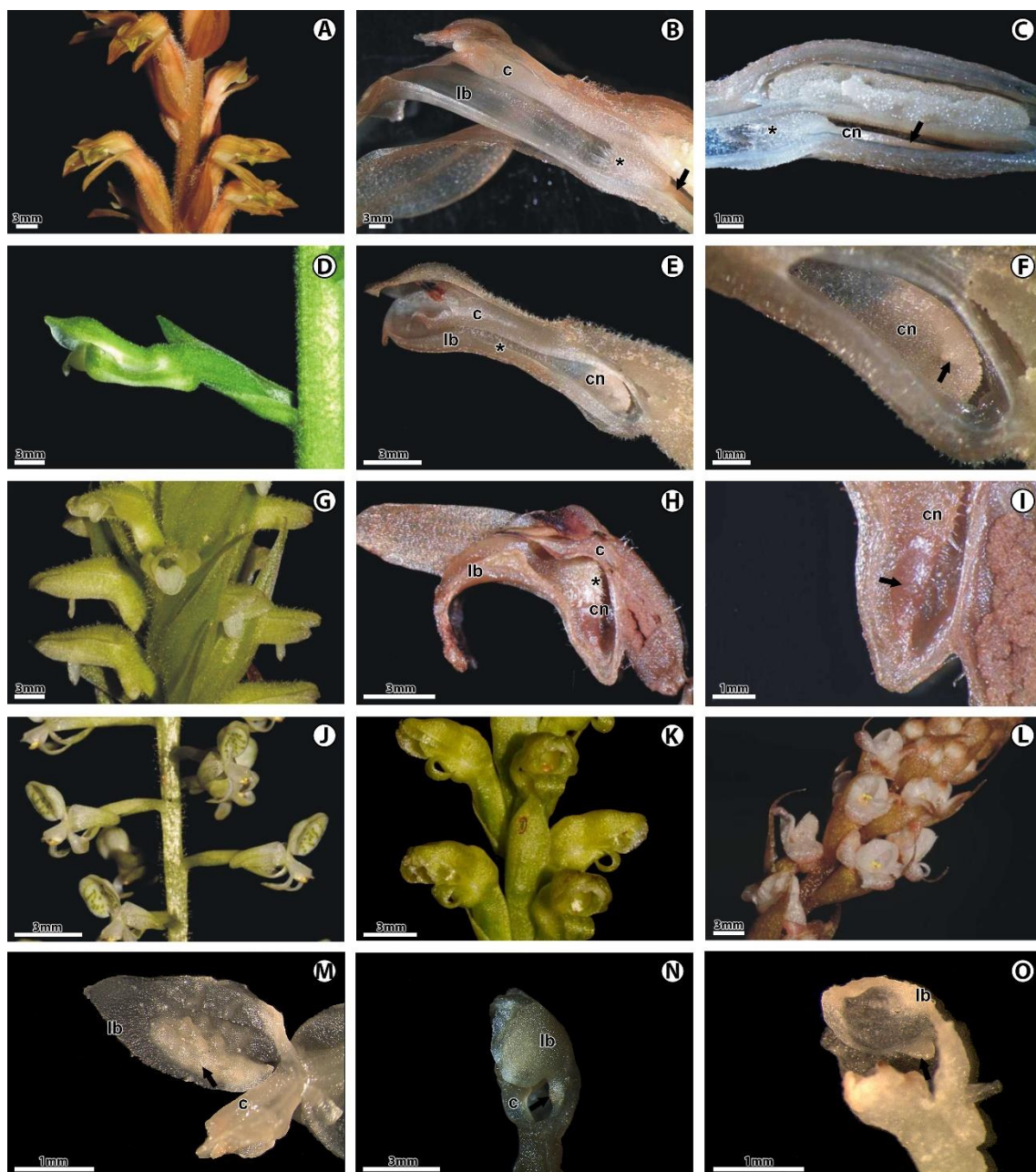


**Figura 2 A-O.** Flores das espécies de Spiranthinae estudadas. **A, D, G, J, M.** Flores; **B, E, H, K, N.** Flores em corte longitudinal mostrando a coluna, presença de tricomas e a cavidade nectarífera; **C, F, I, L, O.** Detalhe da cavidade nectarífera e do nectário. **A-C.** *Beloglottis mexicana*. **D-F.** *Cyclopogon elatus*. **G-I.** *Cyclopogon chloroleucus*. **J-L.** *Dichromanthus cinnabarinus*. **M-O.** *Eltrophectris triloba*. (c – coluna, cn – cavidade nectarífera, lb – labelo, seta preta – nectário, \* - tricomas). Fotos: A-C e J – Gerardo A. Salazar.



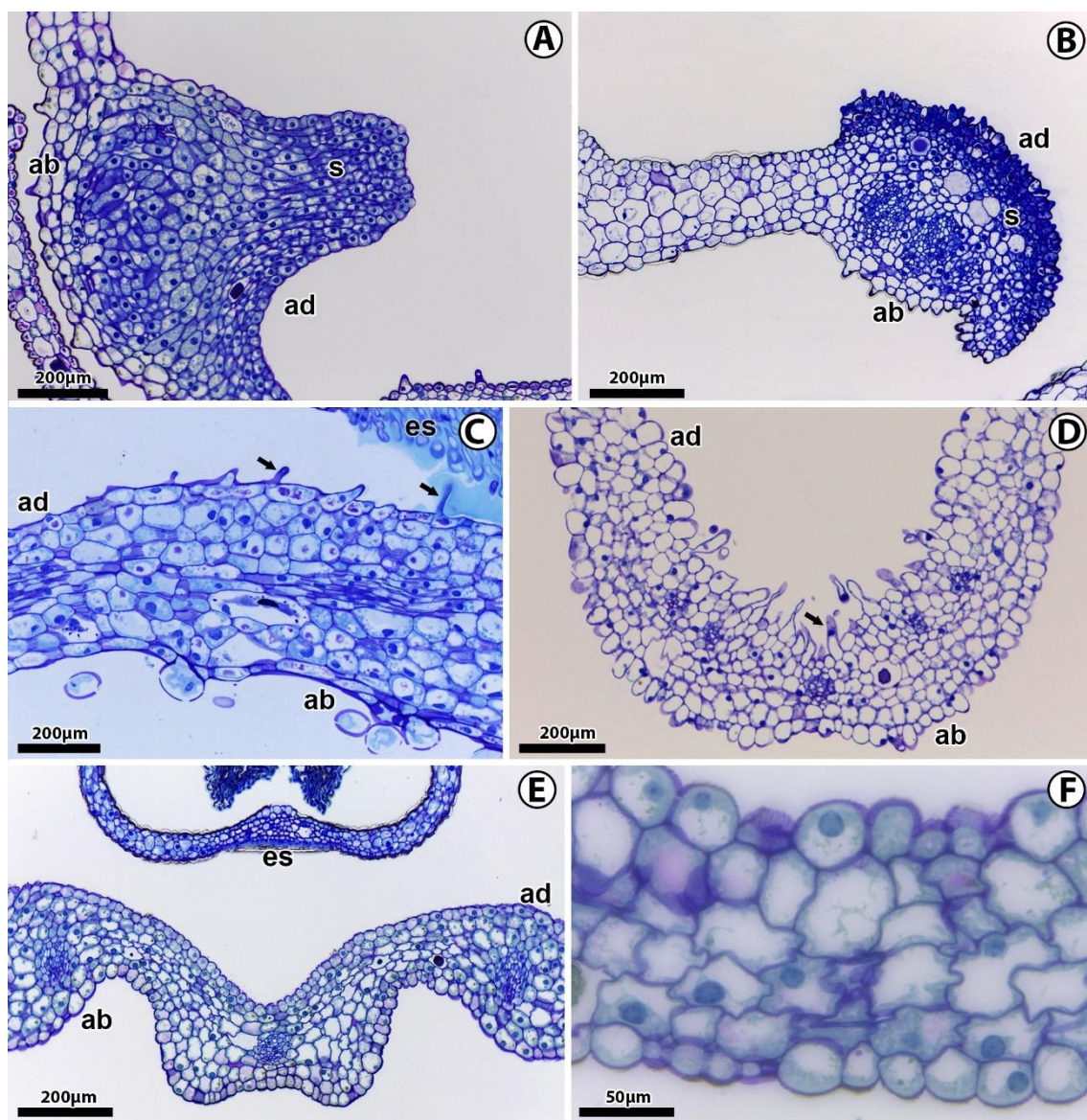
**Figura 3 A-O.** Flores das espécies de Spiranthinae estudadas. **A, D, G, J, M.** Flores; **B, E, H, K, N.** Flores em corte longitudinal mostrando a coluna, presença de tricomas e a cavidade nectarífera; **C, F, I, L, O.** Detalhe da cavidade nectarífera e do nectário. **A-C.** *Lankesterella ceracifolia*. **D-F.** *Mesadenella cuspidata*. **G-I.** *Pelexia pterygantha*. **J-L.** *Pteroglossa roseo-alba*. **M-O.** *Sacoila lanceolata*. (c – coluna, cn – cavidade nectarífera, lb – labelo, seta preta – nectário, \* - tricomas). Fotos: A – Gerardo A. Salazar; G – João A. N. Batista; J – Emerson R. Pansarin.





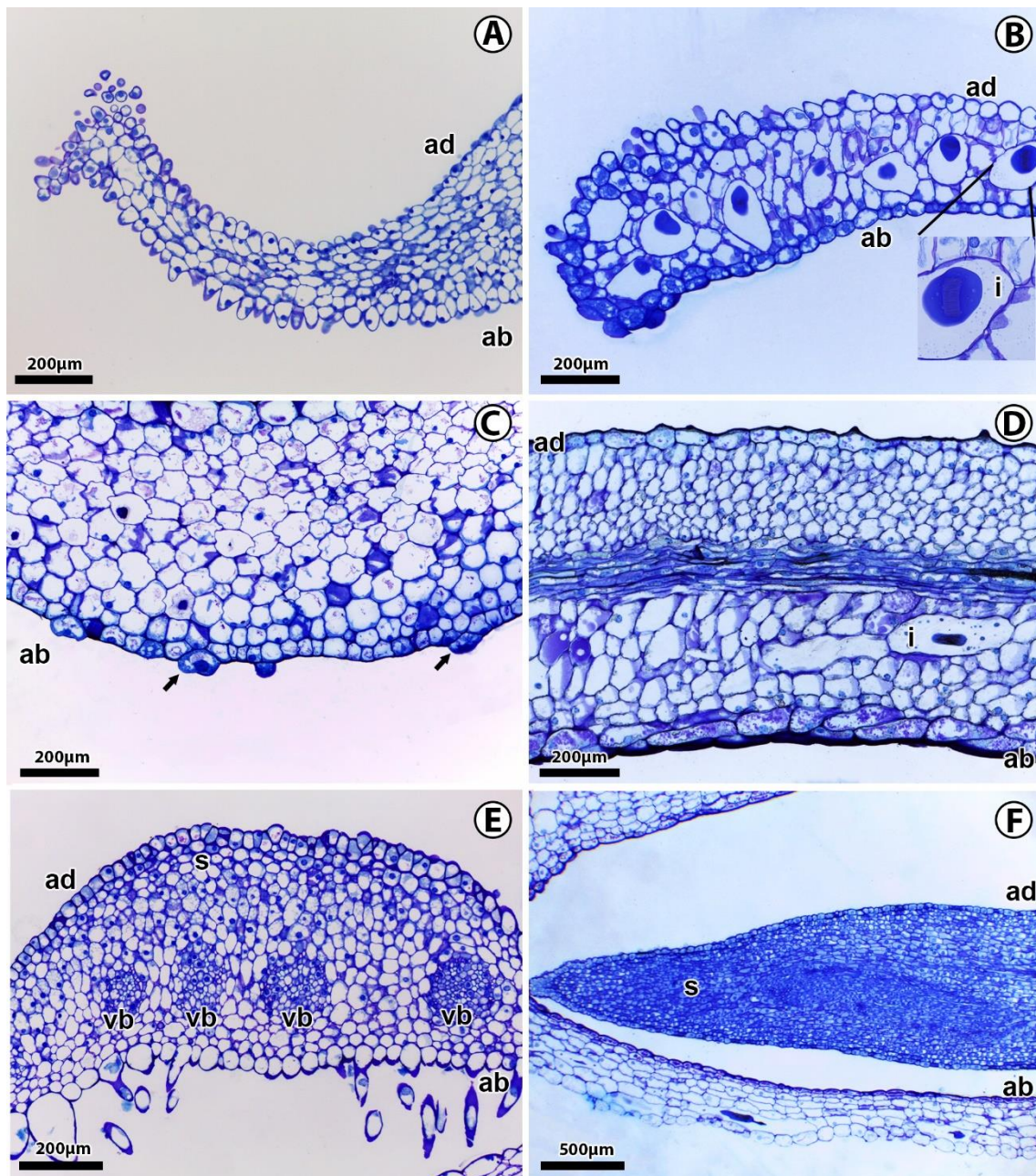
**Figura 4.** Flores das espécies de Spiranthinae (A-I) e Cranichidinae (J-O) estudadas. B, E, H, M, N, O. Flores em corte longitudinal mostrando a coluna, presença de tricomas e a cavidade nectarífera (em N, apenas sépalos e pétalas removidas); C, F, I. Detalhes da cavidade nectarífera e do nectário. A-C. *Sarcoglottis fasciculata*. D-F. *Sauroglossum elatum*. G-I. *Skeprostachys balanophorostachya*. J, M. *Cranichis candida*. K, N. *Prescottia glazioviana*. L, O. *Prescottia oligantha*. (c – coluna, cn – cavidade nectarífera, lb – labelo, seta preta – nectário, \* - tricomas). Fotos: A, G, J, L, M – João A. N. Batista.



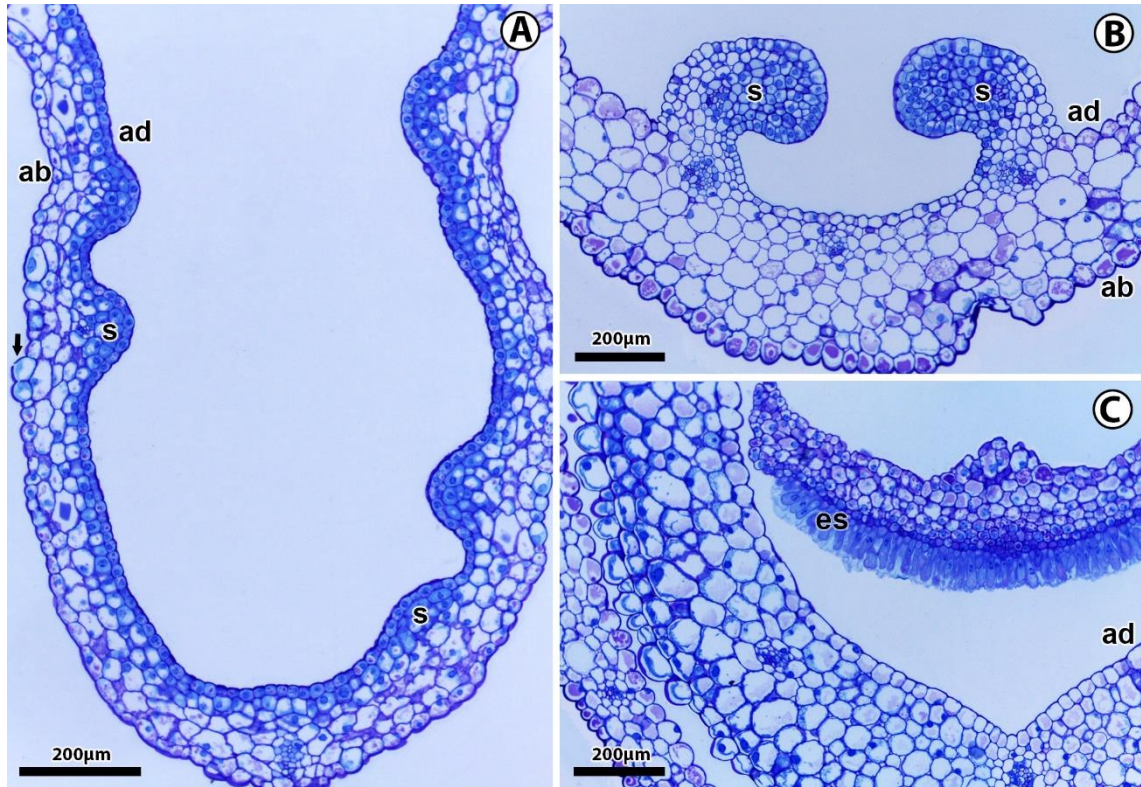


**Figura 5 A-F.** Secções do labelo de flores do labelo de Spiranthinae. **A.** *Cyclopogon chloroleucus*, notar a elevada densidade citoplasmática na porção adaxial, caracterizando o nectário em secção transversal. **B.** Nectário de *Pteroglossa roseo-alba* em secção transversal; além da elevada densidade citoplasmática das células secretoras, a epiderme mostra-se papilosa. **C.** Secção longitudinal da região mediana do labelo de *Cyclopogon elatus*, com presença de tricomas próximo à região estigmática. **D.** Secção transversal da região mediana do labelo de *Mesadenella cuspidata*, que possui tricomas na face adaxial, porém não próximo à região estigmática. **E - F.** Secção transversal da região mediana do labelo de *C. chloroleucus*, onde não há presença de tricomas próximo à região estigmática; notar a presença de células com potencial secretor em ambas as faces do labelo, e células parenquimáticas de citoplasma denso e muito vacuoladas. (ab, face abaxial do labelo; ad, face adaxial do labelo; es, estigma; s, tecido secretor; seta, tricoma).



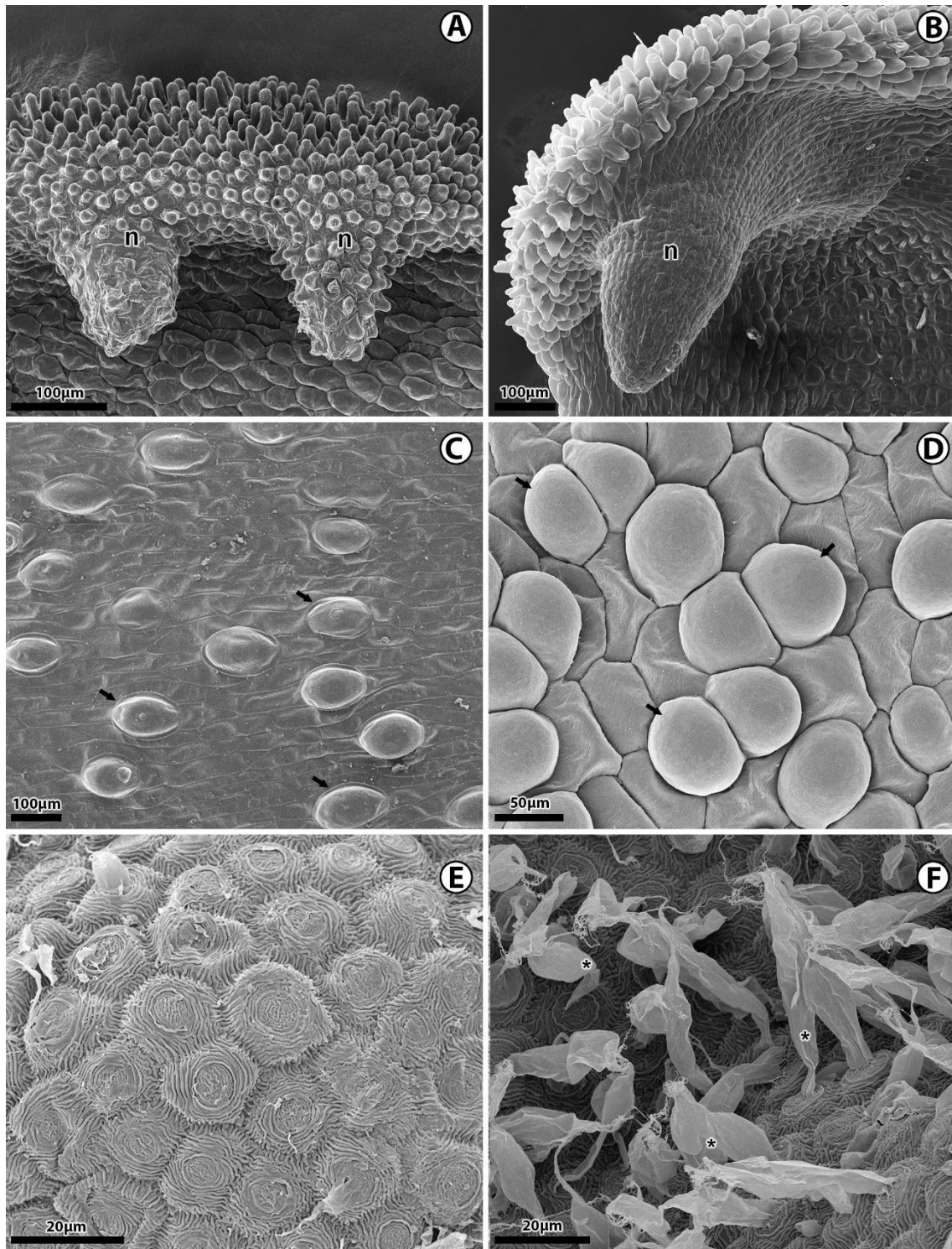


**Figura 6 A-F.** Secções do labelo de flores de espécies de Spiranthinae. **A-B.** Secções longitudinais do terço apical do labelo de *Mesadenella cuspidata* (A) com papilas não glandulares e *Beloglottis mexicana* (B) com papilas glandulares. Ainda em B, detalhe de idioblasto contendo ráfides de oxalato de cálcio. **C.** Terço médio do labelo de *Pelexia pterygantha*. **D.** Terço médio do labelo de *Sarcoglottis fasciculata*. **E.** Nectário de *P. pterygantha* em secção transversal, onde as células de alta densidade citoplasmática se encontram apenas na face adaxial, e a face abaxial possui células com vacúolos grandes, próximas aos numerosos feixes vasculares. **F.** Nectário de *S. fasciculata* em secção longitudinal; todo o mesofilo é secretor, com células de elevada densidade citoplasmática. (ab, face abaxial do labelo; ad, face adaxial do labelo; vb, feixe vascular; i, idioblasto contendo ráfides de oxalato de cálcio; s, tecido secretor; seta, células globosas na região do osmóforo).

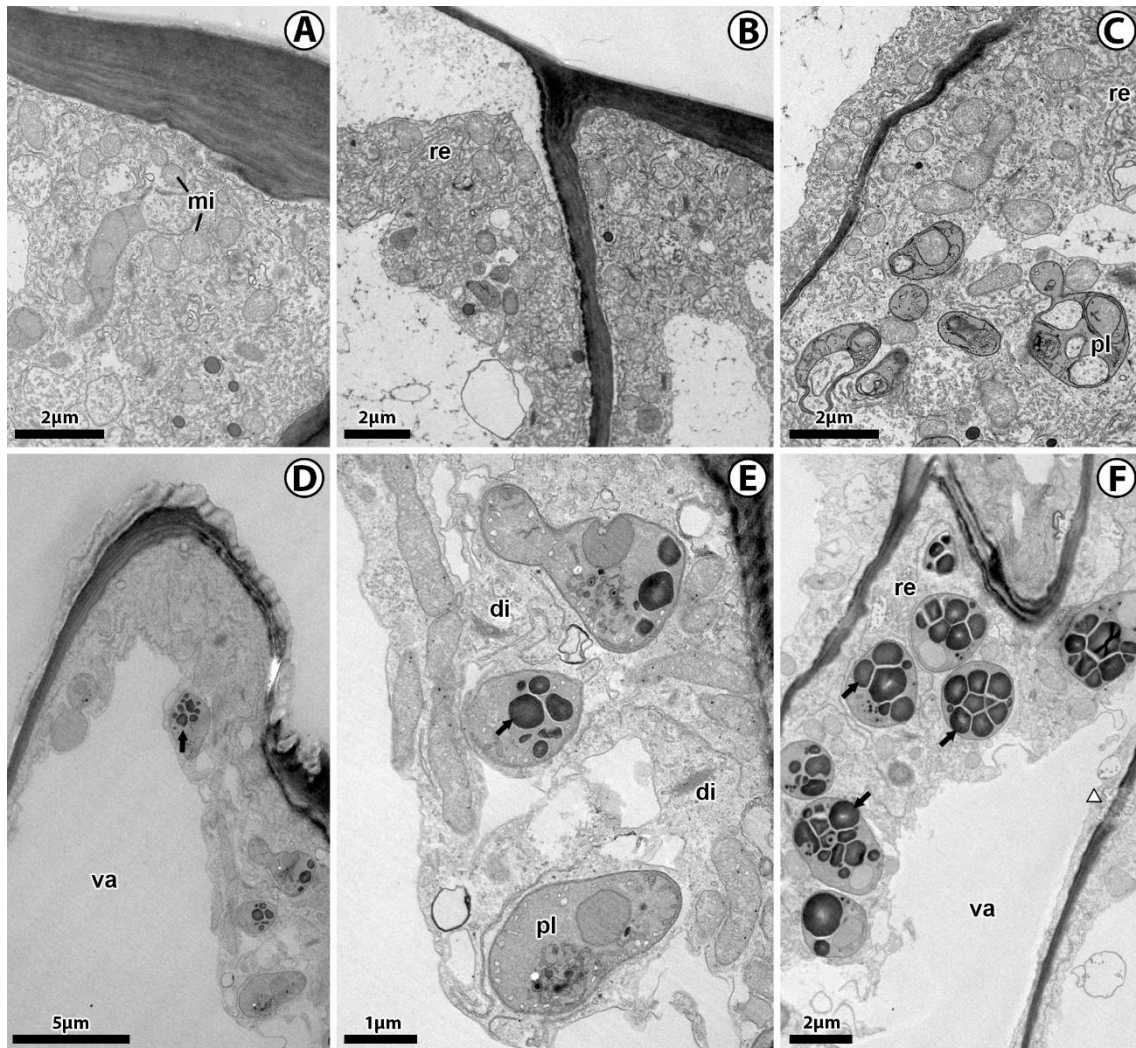


**Figura 7 A-C.** Secções transversais do labelo flores de espécies de Cranichidinae. **A.** Secção da região mediana do labelo de *Cranichis candida*, onde as células com elevada densidade citoplasmática se estendem por toda a face adaxial, caracterizando o nectário dessa espécie, e a face abaxial apresenta células globosas de citoplasma denso. **B-C.** Secção de *Prescottia glazioviana*, sendo **B** na região das aurículas, que apresentam células secretoras e **C** na região mediana, próximo ao estigma, não apresentando tricomas na face adaxial, e com células globosas e vacuoladas na face abaxial. (ab, face abaxial do labelo; ad, face adaxial do labelo; es, estigma; s, tecido secretor; seta, célula globosa na região do osmóforo).

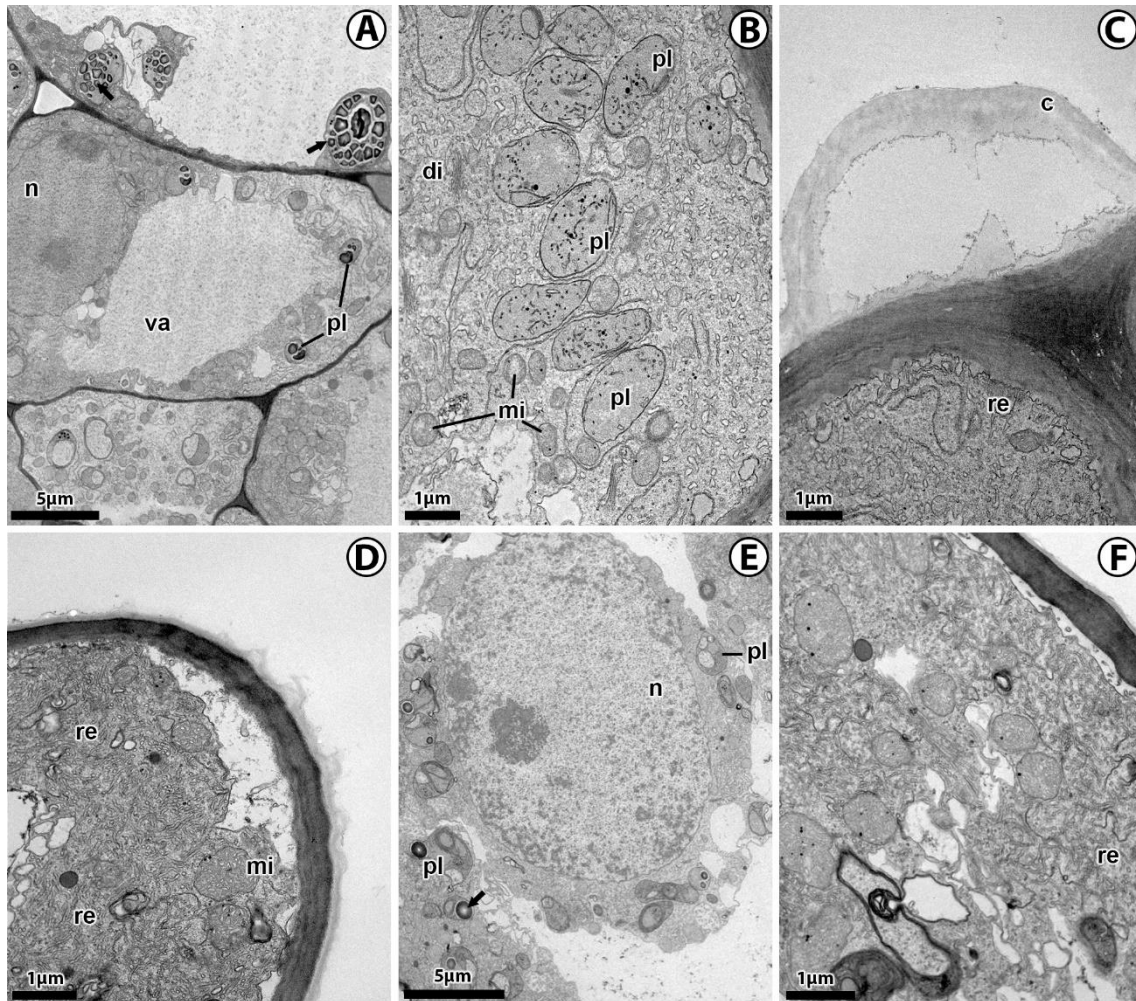




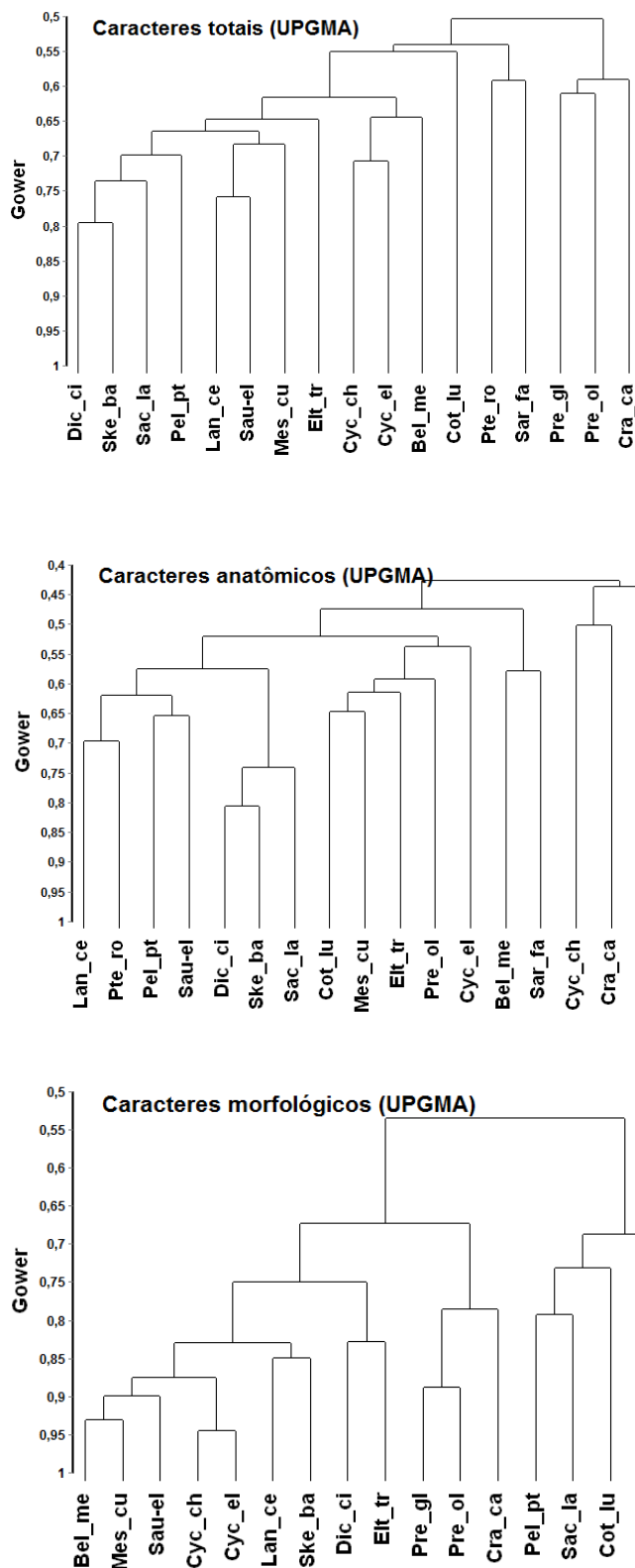
**Figura 8 A-F.** Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura do labelo de flores de espécies de Spiranthinae e Cranichidinae. **A.** Notar a presença de papilas na epiderme do nectário de *Lankesterella ceracifolia*, que possui mais de um lobo. **B.** Nectário de *Cyclopogon elatus* com epiderme secretora plana, e tricomas não glandulares na face abaxial. **C.** Face abaxial do labelo de *Pelexia pterygantha*, com a região do osmóforo apresentando células globosas distribuídas de maneira mais esparsa. **D.** Face abaxial do labelo de *Cotylolabium lutzii*, na região do osmóforo, onde as células globosas podem ser encontradas associadas em pequenos grupos, e se distribuem de maneira mais próxima. **E-F.** Face adaxial do labelo de *Cranichis candida*, onde é possível notar as células estriadas da epiderme secretora em E, e as mesmas células com prolongamentos da cutícula em F. (n, nectário; seta, células globosas na região do osmóforo; \*, cutícula)



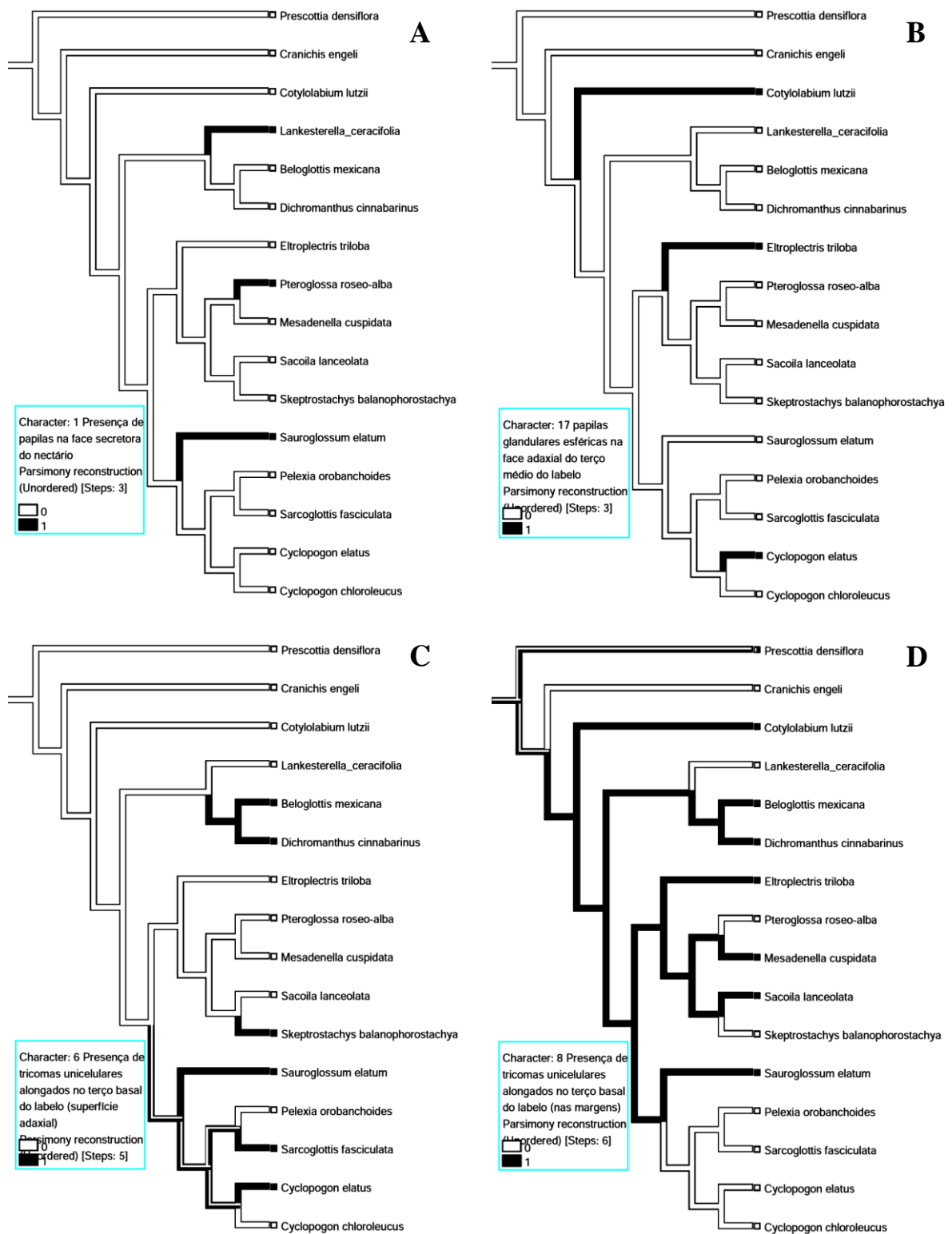
**Figura 9 A-F.** Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão do labelo de duas espécies Spiranthinae. **A-C.** Labelo de *Cyclopogon elatus*. **D-F.** Labelo de *Sauroglossum elatum*. Notar o citoplasma denso rico em mitocôndrias, retículo endoplasmático e plastídios contendo grãos de amido. Plastídios podem ser observados em associação com segmentos de retículo endoplasmático em E e F. Em F também é possível notar plasmodesmos estabelecendo conexões citoplasmáticas entre células adjacentes. (di, dictiosomo; mi, mitocôndria; pl, plastídio; re, retículo endoplasmático; va, vacúolo; seta, grãos de amido; cabeça de seta, plasmodesmo)



**Figura 10 A-F.** Imagens Microscopia Eletrônica de Varredura do nectário de flores de duas espécies Spiranthinae. **A-C.** Nectário de *Pelexia pterygantha*. **D-F.** Nectário de *Cyclopogon elatus*. Notar o citoplasma denso, rico em mitocôndrias, vesículas e segmentos de retículo endoplasmático, e núcleo grande com nucléolos conspícuos. Em C há evidências de fusão entre vesículas e a membrana plasmática, assim como acúmulo de secreção na superfície da parede celular. (c, cutícula; di, dictiossomo; mi, mitocôndria; n, núcleo; pl, plastídio; re, retículo endoplasmático; va, vacúolo; seta, grãos de amido)

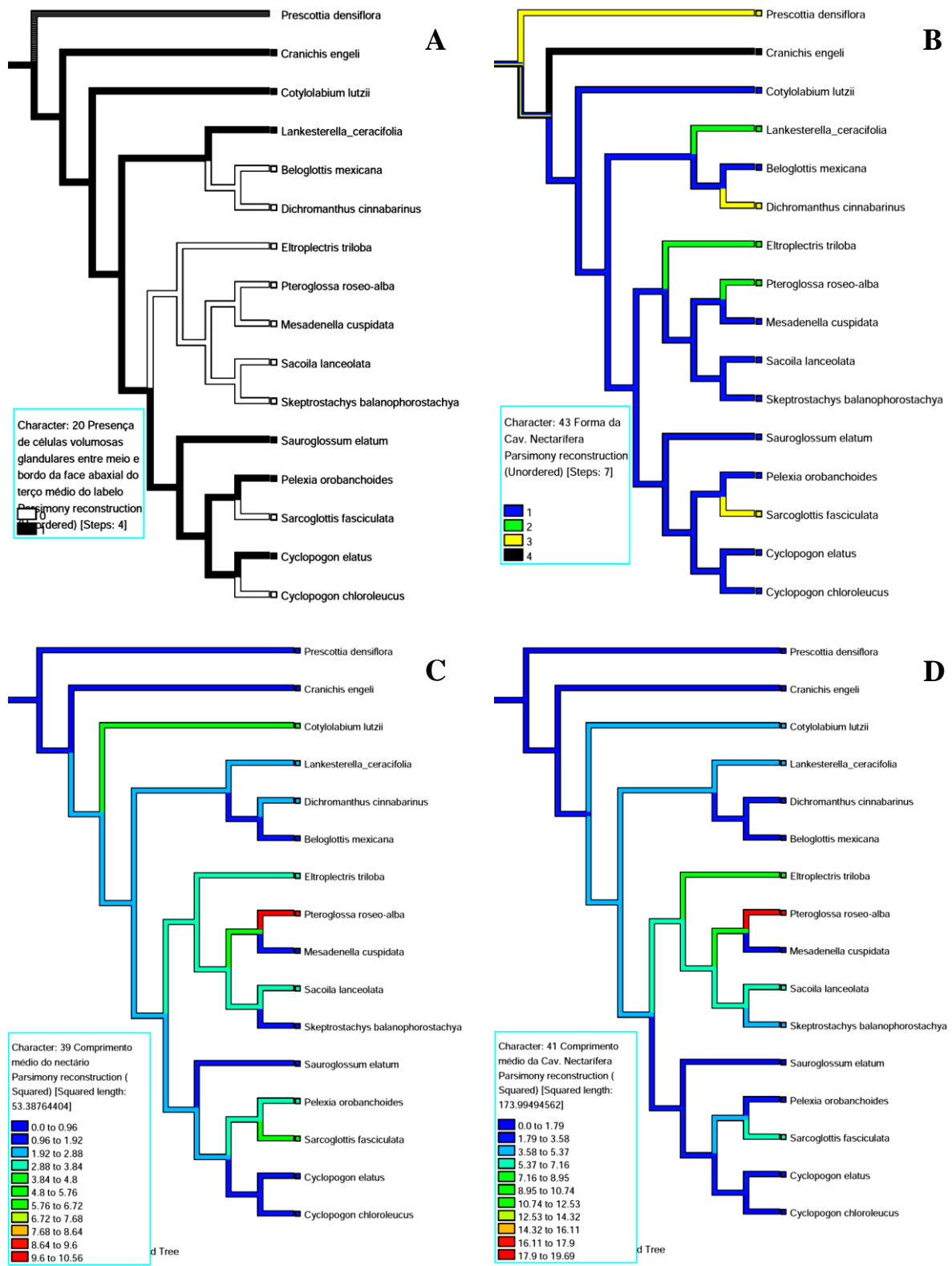


**Figura 11.** Dendrograma mostrando as relações fenéticas entre 14 espécies de Spiranthinae e 3 de Cranichidinae, a partir das matrizes de caracteres anatômicos (n=27), morfológicos (n=18) e todos os caracteres agrupados (n=45), utilizando o coeficiente de similaridade de Gower e UPGMA como algoritmo de agrupamento. Para nomes das espécies, veja Tabela 1.



**Figura 12.** Otimização mais parcimoniosa na árvore filogenética de sequências de DNA nuclear (ITS) e de cloroplasto (*matK-trnK* e *trnL-trnF*). **A.** Presença de papilas na superfície secretora do nectário. **B.** Presença de papilas glandulares esféricas na face adaxial do terço médio do labelo. **C.** Presença de tricomas unicelulares alongados na superfície adaxial do terço basal do labelo. **D.** Presença de tricomas unicelulares alongados nas margens do terço basal do labelo. Branco = ausência; preto = presença.





**Figura 13.** Otimização mais parcimoniosa na árvore filogenética de seqüências de DNA nuclear (ITS) e de cloroplasto (*matK-trnK* e *trnL-trnF*). **A.** Presença de células volumosas glandulares entre meio e bordo da face abaxial do terço médio do labelo (branco = ausência; preto = presença). **B.** Forma da cavidade nectarífera (1 - mento, 2 - cálc, 3 - decurrente, 4 - ausente). **C.** Comprimento médio do nectário. **D.** Comprimento médio da cavidade nectarífera.